



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/28247  (43) Date de publication internationale: 7 août 1997 (07.08.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00167</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1997 (28.01.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/01004 29 janvier 1996 (29.01.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIOCEM [FR/FR]; Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): LUDEVID, Dolorès [ES/ES]; Centro de Investigacion y Desarrollo CSIC, Jordi Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelone (ES). TORRENT, Margarita [ES/ES]; Centro de Investigacion y Desarrollo CSIC, Jordi Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelone (ES). ALVAREZ, Inaki [ES/ES]; Centro de Investigacion y Desarrollo CSIC, Jordi Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelone (ES). PEREZ, Pascual [FR/FR]; 21, allée du Parc, F-63110 Beaumont (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b>  <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: AMINO ACID-ENRICHED PLANT PROTEIN RESERVES, PARTICULARLY LYSINE-ENRICHED MAIZE <math>\gamma</math>-ZEIN, AND PLANTS EXPRESSING SUCH PROTEINS</p> <p>(54) Titre: PROTEINES DE RESERVE DE PLANTES ENRICHIES EN ACIDES AMINES, NOTAMMENT <math>\gamma</math>-ZEINE DE MAIS ENRICHE EN LYSINE, PLANTES EXPRIMANT CES PROTEINES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An oligonucleotide including at least one concatenation coding for a polypeptide of formula (P-K)<sub>n</sub>, wherein n is an integer of at least 2, P is a proline amino acid residue, K is a lysine amino acid residue, and the sign "—" is a bond, particularly a peptide bond, between the two amino acid residues. The n (P-K) units are also bound together by such bonds, e.g. peptide bonds.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet un oligonucléotide comprenant au moins un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule (P-K)<sub>n</sub>, dans laquelle: n est un entier supérieur ou égal à 2, P représente un résidu d'acide aminé Proline, K représente un résidu d'acide aminé Lysine, le signe "—" symbolise une liaison entre les deux résidus d'acides aminés et notamment une liaison de type peptidique, les n unités (P-K) étant liées entre elles également par de telles liaisons par exemple de type peptidique.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Protéines de réserve de plantes enrichies en acides aminés,  
notamment y-zéine de maïs enrichie en lysine Plantes exprimant ces  
protéines

5        La présente demande a pour objet de nouveaux moyens permettant la préparation de plantes exprimant des protéines de réserve enrichies en acides aminés déficitaires dans les protéines de réserve normales, et en particulier de protéines de réserves enrichies en lysine. L'invention a également pour objet les protéines de réserve ainsi modifiées, ainsi que  
10      des plantes exprimant ces protéines de réserve modifiées.

De nombreuses plantes, le cas échéant après transformation par des étapes physico-chimiques, sont d'une importance économique majeure dans l'alimentation humaine ou animale, et le problème de l'amélioration de leur qualité nutritionnelle a déjà donné lieu à différents types de recherches. En particulier, pour remédier à l'insuffisante présence de certains acides aminés dans les protéines de réserve des plantes, on a mis au point des variétés sélectionnées présentant des qualités nutritionnelles supérieures, ou proposé différentes modifications faisant appel à l'utilisation des techniques du génie génétique afin de favoriser ou  
15      20      d'augmenter la production dans ces plantes notamment de certains acides aminés déficitaires, et néanmoins importants pour les qualités nutritionnelles de la plante. Ces acides aminés déficitaires sont par exemple la lysine, la méthionine.

Dans le cadre de la présente demande, les inventeurs se sont proposés d'apporter une solution originale au problème de l'amélioration des plantes, notamment de l'amélioration de leurs qualités nutritionnelles et ont à cet effet travaillé en premier lieu à partir d'une plante d'importance économique considérable, le maïs. Plus précisément, ils se sont intéressés aux protéines de réserve de l'endosperme des semences de maïs,

protéines qui comprennent notamment les zéines et, en particulier, la  $\gamma$ -zéine.

Au cours du développement des semences de maïs, les cellules de l'endosperme synthétisent de grandes quantités de protéines de réserve, 5 et notamment de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -zéines. Ces zéines sont accumulées dans les corps protéiques dérivés du réticulum endoplasmique (ER).

D'une façon générale, les zéines représentent un groupe complexe de protéines, réparties en plusieurs groupes,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, et  $\delta$ -zéines (Larkins et al, 1989), codées par une famille multigénique (Hagen et Rubenstein, 10 1980, Gene 13, 239-249). Bien qu'elles présentent une structure variable, ces protéines ont des caractéristiques communes : la présence dans leur structure primaire de répétitions en tandem riches en résidus d'acides aminés de type Proline, la présence de nombreux résidus hydrophobes qui confèrent leur insolubilité à ces protéines dans un milieu aqueux, et 15 l'absence de résidus lysine, acides aminés essentiels pour l'homme et les animaux monogastriques. L'absence de lysine dans toutes les protéines majoritaires (déetectées en grande quantité dans l'endosperme) naturellement produites de la famille des zéines conduit à une composition en acides aminés déséquilibrée dans les semences de maïs.

20 Parmi ces protéines, la  $\gamma$ -zéine de maïs est une protéine ayant un poids moléculaire de 28 kDa, dont la séquence codante a été décrite sous la forme de l'ADNc par Prat et al (Nucleic Acids Research, vol. 13, n° 5, 1985, p. 1494-1504). La séquence complète du gène codant pour la  $\gamma$ -zéine, y compris les séquences non codantes en amont et en aval 25 contenant les éléments de régulation de l'expression, a été décrite par Reina, M. et al (Nucleic Acids Research, vol. 18, n° 21, 1990, p 6426).

Jusqu'à présent, différentes approches ont été envisagées pour augmenter la teneur en lysine des protéines de la famille des zéines. A cet égard, des approches génétiques et moléculaires ont été mises en oeuvre.

Par exemple, des mutants permettant l'obtention de maïs riche en lysine, tels que le mutant opaque-2 (o2) et le mutant floury-2 (fl-2) (Mertz et al, 1964, Science 145, 279-280, Nelson et al, 1965, Science 150, 1469-1470) ont ainsi été proposés et des tentatives pour remédier aux effets néfastes 5 de l'absence de certaines classes de zéines, notamment les  $\alpha$ -zéines, sur les caractéristiques phénotypiques, par sélection de maïs contenant des gènes modificateurs o2 (Paez et al, 1969, Plant Sci. 9, 251-252, Geetha et al, 1991, Plant Cell 3, 1207-1219) ont été faites.

Une autre approche a consisté à réaliser une action indirecte sur la 10 production de lysine libre, en particulier dans les plantes dicotylédones. Cette technique a été mise en oeuvre en agissant sur la dérégulation des enzymes clé (DHTPS et AK) impliquées dans le cycle de la biosynthèse de la lysine via l'aspartate. Un accroissement sensible des niveaux de lysine libre a été obtenu dans les feuilles, mais pas dans les semences, dans des 15 expériences de transformation de plantes de tabac avec des bactéries E. coli contenant les gènes dapA et des bactéries E. coli contenant le gène lysC (Shaul et Galili, 1992, Plant J. 2, 203-209 et 1993, Plant Mol. Biol. 23, 759-768 ; Perl, A., Schaul O., Galili, G., 1992, Plant Molecular Biology, 19, p. 815-823). Récemment, les mêmes gènes dapA de Corynebacterium et 20 lysC de E. coli ont été utilisés et exprimés sous le contrôle d'un promoteur spécifique des semences dans des plantes de soja. L'expression de ces deux enzymes dans le soja a conduit à une augmentation de cinq fois de la teneur en lysine dans les semences (Falco et al, 1995, BIO-Technology 13, 577-582).

D'autres auteurs (Wallace et al, 1988, Science 240, 662-664) ont 25 tenté d'augmenter la lysine dans l' $\alpha$ -zéine (19 kDa) des semences de maïs en incorporant de façon ponctuelle des résidus lysine en différentes positions dans la molécule d' $\alpha$ -zéine. L'expression de ces constructions dans des oocytes de Xenopus a conduit à l'assemblage correct des zéines 30 riches en lysine dans les vésicules analogues des corps protéiques.

Cependant, l' $\alpha$ -zéine normale et la forme modifiée enrichie en lysine étaient dégradées lorsqu'elles étaient exprimées dans des semences de tabac (Othani et al, 1991, Plant Mol. Biol. 16:117).

On ne disposait donc pas à ce jour de connaissances quant aux 5 moyens pouvant permettre l'expression d'une zéine enrichie en lysine dans les cellules la produisant naturellement dans le maïs, c'est-à-dire dans les cellules de l'endosperme. A fortiori l'expression dans d'autres cellules végétales de zéines enrichies en lysine n'était pas maîtrisée.

L'un des buts de l'invention est donc de proposer des moyens 10 permettant d'obtenir une zéine enrichie en lysine, en particulier une  $\gamma$ -zéine de maïs enrichie en lysine, cette protéine étant exprimée notamment dans les cellules des semences de maïs et en particulier dans les cellules de l'endosperme, ladite protéine modifiée étant en outre exprimée de façon telle que ses propriétés quant à la localisation et l'accumulation au niveau 15 du réticulum endoplasmique et des corps protéiques dérivés soient préservées.

L'expression « enrichie en lysine » signifie, dans le contexte de la présente demande, que la protéine comporte un nombre augmenté de résidus lysine par rapport à la protéine naturelle dont elle est dérivée, par 20 exemple par suite d'une modification de la séquence de nucléotides qui l'exprime.

L'invention propose aussi des moyens pour obtenir l'expression de protéines, de préférence de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine, dans des cellules végétales de différents tissus, par exemples des tissus de feuilles ou de 25 racines, et ce le cas échéant dans des cellules végétales de plantes n'exprimant pas naturellement la protéine, en particulier la  $\gamma$ -zéine dont la production est recherchée.

Par ailleurs, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, d'autres protéines de réserve peuvent être enrichies en lysine selon des modalités analogues.

Les inventeurs se sont proposés dans un premier temps, pour 5 réaliser l'invention, d'introduire dans le gène codant pour la  $\gamma$ -zéine ou pour d'autres protéines de réserve du maïs ou d'autres plantes, ou dans la séquence codante de ce gène, des séquences codant pour des polypeptides enrichis en lysine, afin d'obtenir la production de  $\gamma$ -zéines ou d'autres protéines enrichies en lysine et donc, de semences enrichies en 10 lysine. Différents sites de la séquence codante du gène de la  $\gamma$ -zéine ont été identifiés comme sites permisifs, (appelés encore "sites neutres") pour préparer des séquences de nucléotides ainsi modifiées.

La présente demande propose donc des moyens pour transformer le gène codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs ou pour transformer toute séquence 15 de nucléotides codant pour la  $\gamma$ -zéine et dérivée de ce gène, de façon à obtenir à partir de l'expression du gène modifié ou plus généralement de la séquence de nucléotides modifiée, une protéine enrichie en lysine; ces moyens comprennent en particulier des oligonucléotides synthétiques codant pour une séquence d'acides aminés comportant des résidus lysine.

20 L'invention a également pour objet des séquences de nucléotides recombinantes ou séquences chimères susceptibles de coder pour une  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine.

Entrent également dans le cadre de l'invention des cellules hôtes transformées par de telles séquences, et en particulier des cellules 25 végétales, par exemple des cellules permettant la régénération de plantes, ainsi que des plantes ou des parties de plantes (tissus, organes,...) contenant de telles cellules et produisant de façon stable des protéines de réserve modifiées, et en particulier des  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine.

L'invention a également pour objet lesdites protéines modifiées, par exemple enrichies en lysine, ainsi que des anticorps dirigés contre ces protéines.

Un oligonucléotide approprié pour la réalisation de l'invention, 5 utilisable pour la préparation de séquences de nucléotides recombinantes, est caractérisé en ce qu'il comprend au moins un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle :

- n est un entier supérieur ou égal à 2,
- P représente un résidu d'acide aminé Proline,
- 10 - K représente un résidu d'acide aminé Lysine,
- le signe "-" symbolise une liaison entre les deux résidus d'acides aminés et notamment une liaison de type peptidique, les n unités  $(P-K)$  étant liées entre elles également par de telles liaisons par exemple de type peptidique.

15 Un oligonucléotide selon l'invention est donc caractérisé selon un premier mode de réalisation, en ce qu'il comprend une séquence codant pour une suite de motifs répétés comportant deux acides aminés.

Les codons de l'oligonucléotide peuvent être identiques pour tous les résidus Proline et/ou pour tous les résidus lysine. Ils peuvent aussi être 20 différents pour un même résidu d'acide aminé, la variation tenant compte de la dégénérescence du code génétique.

De préférence, cet oligonucléotide est formé par une séquence codant pour plus de 2 unités  $(P-K)$ . De préférence n est inférieur ou égal à 30, en particulier inférieur à 20 et avantageusement n est égal à 4, 5, 6, 7, 25 8, 9 ou 10 ou 15.

Les "oligonucléotides" selon l'invention peuvent être synthétisés chimiquement par toute technique disponible.

Le terme "polypeptide" par référence à l'enchaînement  $(P-K)_n$ , désigne, dans le cadre de la présente demande, une séquence d'acides

aminés comportant plus de 2 résidus d'acides aminés et pouvant comporter jusqu'à 60 résidus d'acides aminés.

Selon une première variante de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide comprend plusieurs enchaînements codant pour un 5 polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , identiques ou différents, associés en tandem.

Ces oligonucléotides sont soit des répétitions d'un même enchaînement, soit des associations d'enchaînement différents. Le nombre d'enchaînements associés est variable, pouvant par exemple être compris 10 entre 2 et 10 enchaînements.

Selon une autre variante de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide précédemment défini est caractérisé en ce qu'il comprend au moins un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle la séquence des n unités  $(P-K)$  est interrompue par un ou plusieurs résidus d'acides aminés différents des résidus P ou K. 15

De préférence, les acides aminés supplémentaires incorporés dans la séquence formée par les unités  $(P-K)$  sont choisis pour ne pas modifier l'organisation du polypeptide codé par l'oligonucléotide, ou à tout le moins 20 pour ne pas provoquer d'interaction avec des acides aminés d'une protéine dans laquelle ledit polypeptide serait incorporé, dans des conditions qui affecteraient la structure et/ou la fonction et/ou la localisation de cette protéine.

Ceci peut en particulier être le cas lorsque le nombre d'unités  $(P-K)$  25 est important ou que plusieurs enchaînements formés de séquences codant pour des motifs  $(P-K)_n$  sont associés en tandem et que la préparation de l'oligonucléotide correspondant nécessite que soient synthétisées plusieurs séquences nucléotidiques qui sont ensuite associées par exemple au moyen de séquences de liaison (linkers).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'oligonucléotide est tel que l'enchaînement codant pour le polypeptide comprenant les n unités (P-K) est complété à son extrémité 5' et/ou à son extrémité 3', par un ou plusieurs codons, codant par exemple pour au moins un résidu lysine à 5 l'extrémité N-terminale du polypeptide.

A titre d'exemple, un oligonucléotide préféré selon l'invention est caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide répondant à la formule (P-K), à la formule K-(P-K)<sub>4</sub>, ou à la formule 2K (P-K)<sub>4</sub>.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition de cet 10 oligonucléotide correspond à l'une des séquences décrites dans les pages qui suivent et identifiées par les désignations SEQ ID No:1 et SEQ ID No:2.

Les oligonucléotides précédemment décrits constituent des moyens de base pour réaliser des séquences de nucléotides recombinantes 15 capables d'exprimer des protéines ou des polypeptides de réserve de plantes enrichis en lysine.

L'invention a donc aussi pour objet une séquence de nucléotides recombinante comprenant un enchaînement de nucléotides codant pour une protéine de réserve d'une plante, caractérisée en ce qu'elle comprend 20 en outre un oligonucléotide selon l'invention, inséré en un site de l'enchaînement de nucléotides choisi de façon telle que :

- l'expression de la séquence de nucléotides dans une cellule végétale déterminée permet d'obtenir une protéine de réserve modifiée localisée de façon identique ou similaire dans cette cellule à la protéine de 25 réserve normale qui serait exprimée dans la même cellule, dans les mêmes conditions par l'enchaînement de nucléotides normal codant correspondant, et/ou

- la protéine de réserve modifiée codée par la séquence de nucléotides est reconnue immunologiquement par des anticorps produits 30 contre la protéine de réserve normale correspondante.

En particulier, les anticorps précités sont constitués par un sérum polyclonal ou sont obtenus contre des épitopes de la protéine de réserve normale qui sont conservés dans la protéine de réserve modifiée.

Les cellules végétales auxquelles il est fait référence ci-dessus 5 comprennent toute cellule végétale, quelle que soit son origine tissulaire ou sa nature. En particulier on s'intéresse dans le cadre de l'invention aux cellules des organes de réserve, mais aussi aux cellules de feuilles, tiges, tubercules ...

Par l'expression "protéine de réserve" d'une plante, on entend dans 10 le cadre de la présente demande une protéine synthétisée durant la maturation des semences et qui est utilisée pendant la phase de germination comme réserve principale de nutrition.

De façon générale, il s'agit d'un polypeptide susceptible d'être synthétisé dans un tissu de réserve quelle qu'en soit la localisation dans la 15 plante ; les protéines de réserve mises en oeuvre dans le cadre de la présente demande sont en particulier celles produites dans les graines ou les semences des plantes de la famille des céréales, des crucifères ou des légumineuses, et sont par exemple les prolamines, les zéines.

Le choix du/des site(s) d'insertion de l'oligonucléotide dans 20 l'enchaînement codant pour la protéine de réserve de plante est déterminé par le respect des conditions ci-dessus énoncées. Selon le cas, l'insertion peut avoir lieu dans un domaine répétitif (en termes de séquence d'acides aminés) de la protéine ou au niveau d'une extrémité C- ou N-terminale.

La condition donnée ci-dessus selon laquelle l'expression de la 25 séquence de nucléotides recombinante de l'invention dans une cellule végétale permet d'obtenir une protéine de réserve modifiée, localisée identiquement ou similairement à la protéine de réserve normale qui serait exprimée dans les mêmes conditions dans la même cellule végétale, comporte par exemple pour les  $\gamma$ -zéines synthétisées, la possibilité d'être 30 accumulées dans le réticulum endoplasmique des cellules végétales qui

l'expriment, et en particulier dans les corps protéiques formés à partir de ce réticulum endoplasmique, lorsque la protéine est exprimée dans les cellules de l'endosperme.

Pour obtenir ce résultat au moyen des séquences de nucléotides recombinantes de l'invention, des systèmes d'expression adaptés à l'hôte cellulaire dans lequel est exprimée la séquence de nucléotides sélectionnée, et notamment les éléments de régulation, par exemple les promoteurs, sont choisis pour leur caractère fonctionnel dans le tissu contenant les cellules transformées. Des tests pour effectuer ce choix peuvent être réalisés en s'appuyant sur les différentes constructions décrites dans les exemples.

Pour vérifier que les propriétés immunologiques de la protéine de réserve modifiée exprimée par la séquence de nucléotides de l'invention n'ont pas été modifiées de façon conséquente, on a utilisé par exemple des antisérum tels que l'antisérum  $\alpha$ G2, décrit précisément dans la partie expérimentale qui suit.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides recombinante est caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir d'un enchaînement codant de nucléotides qui conduit à l'expression d'une protéine de réserve naturellement pauvre en lysine.

De façon générale, cette séquence de nucléotides recombinante code pour une protéine de réserve modifiée dérivée d'une protéine de réserve naturellement produite par une plante utilisable en alimentation animale ou humaine.

Ainsi, les protéines de réserve dont on modifie la teneur en lysine dans le cadre de la présente invention sont avantageusement des protéines de réserve de plantes de la famille des céréales, des légumineuses ou des crucifères. Des protéines de réserve particulièrement importantes sont celles du maïs, en particulier les zéines, et plus

spécialement la  $\gamma$ -zéine du maïs, dont on cherche à augmenter la teneur en lysine.

Une séquence de nucléotides recombinante particulière selon l'invention est caractérisée en ce que l'enchaînement codant de nucléotides codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs qu'elle contient, répond à la séquence présentée sur la Figure 9.

D'autres séquences de nucléotides recombinantes de l'invention sont caractérisées en ce que l'enchaînement codant de nucléotides qu'elles comprennent, code pour une protéine de réserve d'une plante choisie parmi les suivantes : le soja, le tournesol, le tabac, le blé, l'avoine, la luzerne, le riz, le colza, le sorgo, Arabidopsis.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, dans la séquence de nucléotides recombinante comprenant un enchaînement codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs, l'oligonucléotide de l'invention est inséré à la place de l'enchaînement codant pour le domaine Pro-X naturellement présent dans la séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine du maïs ou à la suite de cet enchaînement. Le domaine Pro-X de la séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine du maïs est constitué par les acides aminés situés entre les positions 70 et 91 de la séquence d'acides aminés représentée à la Figure 9, correspondant aux nucléotides 265 à 330 de la séquence représentée à la Figure 9.

De façon préférée, dans la séquence de nucléotides de l'invention, l'oligonucléotide à la place ou à la suite du domaine Pro-X présent entre les nucléotides 276 et 357 de la séquence représentée à la Figure 9.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, dans la séquence de nucléotides recombinante comprenant un enchaînement codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs, l'oligonucléotide de l'invention est inséré à la suite du domaine Pro-X conservé dans la séquence de la  $\gamma$ -zéine du maïs.

Selon une autre variante de réalisation, dans la séquence de nucléotides recombinante comprenant un enchaînement codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs, l'oligonucléotide de l'invention est inséré dans le domaine Pro-X maintenu dans la séquence de la  $\gamma$ -zéine.

5 Les insertions dont il est question ci-dessus sont réalisables par les techniques disponibles, par exemple par recombinaison des séquences ayant subi une ou plusieurs étapes de digestion enzymatique.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, une protéine de réserve choisie enrichie en un acide aminé déterminé est exprimée  
10 dans des cellules végétales hétérologues. En d'autres termes une protéine de réserve présente naturellement dans une plante donnée, est exprimée sous forme enrichie en acides aminés, dans une autre plante, ou dans une autre cellule que celle qui la produit naturellement.

Outre l'enchaînement codant pour une protéine de réserve de plante  
15 et l'oligonucléotide de l'invention, les séquences de nucléotides recombinantes de l'invention peuvent également comprendre un promoteur d'expression et, par exemple, un promoteur choisi pour son caractère spécifique pour l'expression dans certaines parties ou dans certains tissus des plantes, ou au contraire un promoteur choisi pour son caractère  
20 constitutif. A titre d'exemple, lorsqu'ils sont spécifiques, les promoteurs peuvent être spécifiques des semences et/ou d'organes ou de tissus déterminés de plantes. Ils peuvent alternativement ou également être spécifiques d'une phase de croissance, par exemple d'un stade déterminé de la germination.

25 A l'inverse l'utilisation de promoteurs constitutifs permet l'expression constante et générale de la protéine de réserve, entraînant une compétition entre l'expression de la protéine de réserve native lorsqu'elle est présente et la protéine de réserve modifiée.

A titre d'exemple, des promoteurs avantageux pour la réalisation de  
30 l'invention sont le promoteur de la  $\gamma$ -zéine du maïs contenu dans la

séquence de 1,7 kb se trouvant en amont de la séquence codante représentée à la Figure 7, le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur, à savoir le promoteur CaMV35S (EP-B-0131623), le promoteur constitutif du gène d'actine 1 de riz (PCT/US 9100073) ou le promoteur 5 semence spécifique "High Molecular weight glutathione" du blé (Colot V. et al, 1987, EMBO Journal, vol. 6, p. 3559-3564).

Le cas échéant, ces promoteurs sont complétés par d'autres séquences de régulation, et en particulier des activateurs d'expression.

A titre d'exemple, d'autres promoteurs utilisables pour la réalisation 10 de l'invention sont par exemple le promoteur du gène codant pour la protéine de réserve 2S des semences d'Arabidopsis thaliana, ou encore les promoteurs de la lectine de haricot ou de la β-phaséoline de haricot.

L'introduction supplémentaire d'activateurs de l'expression dans les 15 séquences de régulation des séquences de nucléotides selon l'invention permet également d'augmenter le niveau de la transcription primaire de la séquence de nucléotides et, le cas échéant, d'augmenter la quantité de protéines de réserves modifiées produites. Des activateurs sont par exemple des introns de monocotylédones tels que l'intron 1 du gène d'actine de riz.

20 L'invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend, en un site non essentiel pour sa réPLICATION, une séquence de nucléotides répondant à l'une des définitions précédemment données. Des vecteurs particuliers intéressants dans le cadre de la réalisation de l'invention sont par exemple les 25 plasmides pP20γZ, pH30γZ ou pH45γZ. Le plasmide pP20γZ a été déposé à la CNCM (Paris, FRANCE) le 31 Octobre 1995 sous le numéro I-1640. Le plasmide pH45γZ a été déposé à la CNCM le 31 Octobre 1995 sous le numéro I-1639.

Entre également dans le cadre de l'invention un polypeptide tel qu'exprimé par une séquence de nucléotides recombinante répondant aux définitions précédentes.

L'expression "polypeptide" n'introduit pas dans le cadre de la 5 présente invention de limitation particulière quant au nombre d'acides aminés formant le polypeptide. Il peut donc s'agir de séquences comportant quelques acides aminés, habituellement désignées par l'expression "peptides", ou encore de séquences beaucoup plus longues telles que celles des protéines.

10 L'invention concerne à cet égard la  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée riche en lysine, caractérisée en ce qu'elle est codée par une séquence de nucléotides recombinante décrite précédemment.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée enrichie en lysine est caractérisée en ce que sa séquence 15 d'acides aminés est modifiée par au moins un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle :

- n est un entier supérieur ou égal à 2,
- P représente un résidu d'acide aminé Proline,
- K représente un résidu d'acide aminé Lysine,

20 - le signe "-" symbolise une liaison entre les deux résidus d'acides aminés et notamment une liaison de type peptidique, les n unités  $(P-K)$  étant liées par des liaisons notamment de type peptidique.

Selon une variante de réalisation de l'invention le polypeptide intégré dans la séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine répond à la 25 formule  $K-(P-K)_n$ .

Les polypeptides de l'invention répondant à l'une des formules  $(P-K)_n$ ,  $K-(P-K)_n$  ou à des variantes sont substitués à une séquence naturellement présente dans la  $\gamma$ -zéine de maïs normale ou insérés avec délétion d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence d'acides aminés

de la  $\gamma$ -zéine de maïs normale, ou ajoutés dans la séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine normale, le site d'insertion du polypeptide étant choisi de façon telle que :

- lorsque la  $\gamma$ -zéine modifiée riche en lysine est produite dans une 5 cellule hôte, notamment une cellule végétale, elle est localisée de façon identique ou similaire dans cette cellule à la  $\gamma$ -zéine de maïs normale qui serait produite dans les mêmes conditions, dans la même cellule hôte et/ou,
- la  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée est reconnue par des anticorps dirigés 10 contre la  $\gamma$ -zéine normale de maïs.

Les protéines P20 $\gamma$ Z représentée à la figure 11 ou H30 $\gamma$ Z ou H45 $\gamma$ Z représentée à la figure 10, sont des exemples préférés de la réalisation de l'invention et représentent des  $\gamma$ -zéines de maïs modifiées enrichies en lysine.

15 L'invention a également pour objet une cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides décrite ci-dessus.

Des cellules hôtes intéressantes sont par exemple les cellules de bactéries, telles que celles de E. coli ou d'Agrobacterium tumefaciens. De 20 préférence, dans le cadre de l'invention, et pour l'expression stable de la protéine de réserve modifiée recherchée, on aura recours à des cellules hôtes d'origine végétale.

A titre d'exemple, ces cellules d'origine végétale sont des cellules de semences, de plante, et par exemple, à titre préféré, des cellules 25 d'endosperme de semences de maïs.

La séquence de nucléotides de l'invention est de préférence introduite dans le génome de la cellule hôte de façon stable et dans des conditions telles que la protéine de réserve exprimée enrichie en acides

aminés et en particulier en lysine est localisée comme le serait la protéine correspondante normale dans la même cellule hôte.

Des techniques variées sont disponibles pour transformer les cellules hôtes. A titre d'exemple, et en vue de transformer de façon stable ou de façon transitoire les cellules hôtes, on utilisera les techniques d'électroporation, de bombardement de microprojectiles portant de l'ADN, via canon à particules, via culture d'explants avec Agrobacterium tumefaciens, par pénétration de microfibres.

Outre les cellules d'endosperme de semences de maïs, des cellules de soja, de tournesol, de tabac, de blé, d'avoine, de luzerne, de riz, de colza, de sorgo ou d'Arabidopsis peuvent être mises en oeuvre pour exprimer les séquences de nucléotides de l'invention.

La présente demande concerne aussi les semences produisant un polypeptide tel que décrit ci-dessus et les plantes produisant ce même polypeptide. De préférence, ces plantes sont du maïs.

L'invention a aussi pour objet des semences obtenues à partir des plantes transformées exprimant le polypeptide de l'invention, en d'autres termes le polypeptide de réserve modifié enrichi en acides aminés déterminés.

Selon un mode de réalisation particulièrement intéressant de l'invention, les protéines  $\gamma$ -zéines modifiées enrichies en lysine, sont exprimées chez des mutants opaque 2 de maïs. Ces mutants o2 décrits par Emerson R.A. et al. (1935, Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Mem. 180) et caractérisés par Mertz E.T. et al (1964, Science 145 : 279-280) voient leur contenu en lysine fortement augmenté améliorant ainsi fortement les qualités nutritives du maïs (compensation de son bas niveau en cet acide aminé essentiel). Les maïs classiques ont un contenu en lysine d'environ 0,24% du produit brut (poids du grain total), les maïs opaque 2 avoisinent en revanche 0,5% en lysine. Cependant ils présentent des caractéristiques agronomiques insuffisantes car leur endosperme est beaucoup moins

vitreux et se révèle très friable (phénotype "starchy"). Ceci a pour effet de les rendre extrêmement sensibles aux organismes pathogènes et aux étapes de traitements post récolte. Ce phénotype est en fait dû à la diminution importante de certaines protéines de réserve en particulier les 5 alpha zéines. En fait Opaque 2 code pour un facteur de transcription nécessaire à l'expression de certains gènes zéines (Schmidt R. J. et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 46-50).

Des dérivés opaque 2 n'ayant plus les inconvénients précités ont été développés par amélioration génétique classique, il s'agit des maïs 10 QPM (Quality Protein Maize). L'analyse génétique récente de ces maïs (Lopes M.A. et al, 1995, Theor. Appl. Genet. 19, 274-281) a montré que seulement 2 ou 3 loci se révèlent clefs dans ces modifications favorables. Des analyses génétiques et biochimiques plus poussées permettent de postuler qu'un des 3 loci responsables est le locus  $\gamma$ -zéine : les génotypes 15 de maïs qui portent une duplication de ce gène situé dans la région centrométrique du chromosome 7, s'avèrent tous être des modificateurs d'opaque 2 (Lopes M.A. et al, 1995, Mol. Gen. Genet. 19 : 247 : 603-613).

La présente invention permet de préparer des maïs mutants opaque 2 à partir de maïs n'ayant qu'un gène de  $\gamma$ -zéine au niveau du chromosome 20 7, qui sont complémentés par l'addition d'une séquence recombinante codant pour une  $\gamma$ -zéine de maïs enrichie en lysine. Outre le fait d'acquérir les propriétés de dureté similaire à un maïs opaque 2 non mutant, il a l'avantage d'augmenter significativement la teneur en lysine, dépassant ainsi celle des maïs QPM.

25 La présente invention permet d'obtenir des mutants opaque 2 de maïs modifiés, dans lesquels on a inséré une séquence de nucléotides recombinante codant pour une  $\gamma$ -zéine de maïs enrichie en lysine.

L'invention a aussi pour objet un procédé pour l'obtention de plantes ou de semences exprimant une protéine de réserve modifiée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) transformation d'une cellule végétale, avec une séquence de nucléotides ou un vecteur ci-dessus décrits, dans des conditions permettant l'expression de façon stable et fonctionnelle de la protéine de réserve modifiée codée par la séquence de nucléotides;
- b) régénération de plantes à partir de la cellule de plante transformée de l'étape a), pour obtenir des plantes exprimant la protéine de réserve modifiée,
- c) le cas échéant, obtention des semences à partir des plantes modifiées obtenues à l'étape b).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la plante transformée est le maïs et la protéine de réserve modifiée enrichie est la  $\gamma$ -zéine, enrichie en lysine.

L'invention concerne aussi les plantes obtenues par mise en oeuvre d'un tel procédé.

Afin d'évaluer la teneur en un acide aminé donné des plantes selon l'invention, il est possible d'utiliser un protocole de dosage tel que celui mentionné dans Zarkadas et al, 1995, J. Agri. Food. Chem. Vol. 43: pages 84-93.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et dans les figures qui suivent.

25 **Figure 1**

- Carte de restriction du plasmide pP20 $\gamma$ Z

**Figure 2**

- Carte de restriction du plasmide pH45 $\gamma$ Z

**Figure 3**

- Représentation schématique des protéines codées par les gènes modifiés et non modifiés de la  $\gamma$ -zéine :  $\gamma$ -zéine de type sauvage ( $\gamma$ Z),  $\gamma$ -zéines riches en lysine (P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z, H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z) résultant de l'insertion des oligonucléotides codant pour des séquences riches en lysine. La séquence d'acides aminés des polypeptides insérés est indiquée en utilisant le code à une lettre de la représentation des acides aminés.
- 5 Les abréviations suivantes sont utilisées :
  - 10 Term : terminal ;
  - ProX DOMAIN : domaine linker proline-Xaa.

**Figure 4** - Analyse in-vitro des  $\gamma$ -zéines riches en lysine. (A) traduction in-vitro et translocation des transcrits correspondant aux  $\gamma$ -zéines modifiées riches en lysine ; lignes 1, 5, 9 et 13 : produits complets de traduction ; lignes 2, 6, 10 et 14 : produits complets de traduction après translocation dans les microsomes canins (CM) ; lignes 3, 7, 11 et 15 : produits de translocation résistant à l'action de la protéinase K (PK) ; lignes 4, 8, 12 et 16 : totalité des produits de traduction après traitement avec la protéinase 20 K en présence de 0,5% Nonidet P40(NP40). (B) Immunoprécipitation des produits de traduction in-vitro correspondant aux protéines  $\gamma$ -zéine et  $\gamma$ -zéine modifiées riches en lysine, en utilisant l'anti-sérum  $\alpha$ PL. Ligne 1 :  $\gamma$ -zéine ; ligne 2 : P20 $\gamma$ Z ; ligne 3 : H30 $\gamma$ Z ; ligne 4 : H45 $\gamma$ Z et ligne 5 : N13 $\gamma$ Z. (C) Même légende que pour (B) mais en utilisant l'antisérum  $\alpha$ G2. Les 25 marqueurs de poids moléculaire (en kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.

**Figure 5** - Activité tissu-spécifique du promoteur de la  $\gamma$ -zéine. Des endospermes de maïs, des embryons et des feuilles de maïs ont été co-

transformés par bombardement de particules en utilisant les constructions représentées dans la figure (dans la partie à droite). Les activités relatives de la luciférase (LUC, colonnes en gris) et de la  $\beta$ -glucuronidase (GUS, colonnes hachurées) ont été exprimées sous la forme d'un multiplicateur des valeurs obtenues avec des projectiles nus  $\pm$  la déviation standard des différents ratios.

**Figure 6** - Expression des  $\gamma$ -zéines riches en lysine dans l'endosperme sub-aleuronique des cellules. (A) Immunoblot avec un antisérum  $\alpha$ PL, de protéines extraites d'endospermes transformés par pN13 $\gamma$ Z (ligne 2), pH45 $\gamma$ Z (ligne 3), pH30 $\gamma$ Z (ligne 4) et pP20 $\gamma$ Z (ligne 5). Le témoin (ligne 1) correspond à des endospermes non transformés. Les marqueurs de poids moléculaire (en kilodaltons) sont indiqués à gauche. (B) expression des transcrits H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z dans des endospermes transformés de façon transitoire. Les cDNAs obtenus à partir des tissus transformés avec pH45 $\gamma$ Z (ligne 2), pN13 $\gamma$ Z (ligne 3) et le témoin (ligne 1) ont été amplifiés par PCR et analysés en utilisant un oligonucléotide synthétique codant pour une séquence riche en lysine à titre de sonde.

**Figure 7** - Accumulation de  $\gamma$ -zéines riches en lysine dans les corps protéiques de l'endosperme. (A) Analyse en immunoblot en utilisant l'antisérum  $\alpha$ PL, des corps protéiques isolés à partir des endospermes transformés avec pP20 $\gamma$ Z (ligne 1), pH30 $\gamma$ Z (ligne 2), pH45 $\gamma$ Z (ligne 3), pN13 $\gamma$ Z (ligne 4) et aucun ADN (ligne 5). (B) Analyse en immunoblot en utilisant l'antisérum  $\alpha$ PL, des corps protéiques isolés à partir des endospermes transformés avec pP20 $\gamma$ Z, pH30 $\gamma$ Z et pH45 $\gamma$ Z et digérés avec la protéinase K en présence d'un tampon isotonique (Sucr., lignes 1, 3 et 5) ou un tampon hypotonique ( $H_2O$ , lignes 2, 4 et 6). Les marqueurs de poids moléculaire (en kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.

**Figure 8** - Co-localisation des protéines P20 $\gamma$ Z avec les  $\alpha$ - et les  $\gamma$ -zéines dans les corps protéiques de l'endosperme du maïs. Une analyse en immunocytochimie a été réalisée sur des sections ultrafines en utilisant 5 des anticorps  $\alpha$ PL (marqués avec des particules d'or de diamètre 15 nm) et des anticorps  $\alpha$ Z et  $\alpha$ G2 (marqués avec des particules d'or de 5 nm). (A) Corps protéiques de l'endosperme transformé avec pP20 $\gamma$ Z, immunomarqué avec l'anticorps  $\alpha$ PL. (B) Immunolocalisation de P20 $\gamma$ Z (marqué avec des particules d'or de 15 nm) et de l' $\alpha$ -zéine (marquée avec 10 les particules d'or de 5 nm) dans les corps protéiques isolés à partir des endospermes transformés avec pP20 $\gamma$ Z. (C) et (D) Immunolocalisation de P20 $\gamma$ Z (marqué avec les particules d'or de 15 nm) et des  $\gamma$ -zéines (marquées avec les particules d'or de 5 nm) dans des corps protéiques isolés à partir des endospermes transformés avec pP20 $\gamma$ Z. Les flèches 15 indiquent les sections tangentielles des corps protéiques.

**Figure 9** - Séquence codante de l'ADNc la  $\gamma$ -zéine de maïs et la séquence d'acides aminés correspondante.

20

**Figure 10** - Séquence codante de l'ADNc de la H45 $\gamma$ Z zéine de maïs et la séquence d'acides aminés correspondante.

La séquence riche en lysine (28 acides aminés) est introduite entre les résidus d'acides aminés 92 et 119 de la séquence représentée à 25 la Figure 10.

**Figure 11** - Séquence codante de l'ADNc de la P20 $\gamma$ Z zéine de maïs et la séquence d'acides aminés correspondante.

La séquence riche en lysine (14 acides aminés) est introduite entre les résidus d'acides aminés 92 et 119 de la séquence représentée à la Figure 11.

5 **Figure 12** - Cartes de restriction des plasmides pBin 19P20 $\gamma$ Z et pBin 19H30 $\gamma$ Z.

**Figure 13** - Endospermes des plants de maïs transgéniques accumulant de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine

10 A et B: SDS-page et Immunoblot utilisant l'antisérum  $\alpha$ PL

A) 10  $\mu$ g de protéine par piste (transformants avec le construit H45 $\gamma$ Z)

piste C: extrait protéique des endospermes d'hybrides B73xA188 (contrôle)

piste 1: A1

15 piste 2: B1

piste 3: B2

piste 4: C1

piste 5: D1

piste 6: D2

20

B) 1  $\mu$ g de protéine par piste (transformants avec le construit P20 $\gamma$ Z)

piste C: contrôle

piste 1: A1

piste 2: A2

25 piste 3: B1

piste 4: C1

piste 5: D1

piste 6: E1

23

C) SDS-page et coloration à l'argent (3 transformants P20 $\gamma$ Z et 3 transformants H45 $\gamma$ Z)

piste 1: A2

piste 2: B1

piste 3: C1

piste 4: B1

piste 5: A1

piste 6: D2

10  $\mu$ g de protéine par piste

piste 7: B1

piste 8: A1

piste 9: D2

40  $\mu$ g de protéine par piste

5 **Figure 14** - Contenu en  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine par grain (transformants 45 $\gamma$ Z B1 et C1)

A: coloration à l'argent; 10  $\mu$ g de protéine par piste

B: immunoblot utilisant l'antisérum  $\alpha$ PL; 1  $\mu$ g de protéine par piste

10 Pistes 1 à 5: extraits protéiques de différents endospermes du transformant 45 $\gamma$ Z B1.

Pistes 6 à 10: extraits protéiques de différents endospermes du transformant 45 $\gamma$ Z C1.

15 **Figure 15** :

A) Contenu en  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine de 10 grains (transformant 45 $\gamma$ Z C1) utilisant l'antiserum  $\alpha$ PL 1  $\mu$ g de protéine par piste

Pistes 1 à 10: extrait d'endospermes de 10 descendants

B) Immunoblot des extraits protéiques des endospermes 1 à 5 présents en A) et marqués avec l'antisérum  $\alpha$ G2; 2  $\mu$ g de protéine par piste.

### EXEMPLES

5

A) Préparation de  $\gamma$ -zéines modifiées enrichies en lysine et expression de ces protéines modifiées suivie de l'accumulation dans les corps protéiques des cellules de l'endosperme de maïs

10 La  $\gamma$ -zéine est une protéine de réserve du maïs, ayant un poids moléculaire de 28 kD, riche en soufre, qui est accumulée dans les cellules de l'endosperme avec les  $\alpha$ -et  $\beta$ -zéines, dans les corps protéiques dérivés du réticulum endoplasmique granulaire (ER) (Ludevid et al., 1984, Plant Mol. Biol. 3, 227-234 ; Lending et al., 1984, Plant Cell 1, 1011-1023). La 15 séquence d'acides aminés déduite de la séquence nucléotidique de l'ADNc (Prat et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13, 1493-1504) et des clones génomiques (Boronat et al., 1986, Plant Sci. 47, 95-102) montre que la  $\gamma$ -zéine n'a pas d'homologie avec les polypeptides de type  $\alpha$ -zéine. Bien que la  $\gamma$ -zéine soit codée par 1 à 2 gènes par génome haploïde (Boronat et al., 20 1986, Plant Sci. 47, 95-102) elle représente 10-15% de la totalité des protéines des endospermes de maïs. L'expression du gène de la  $\gamma$ -zéine dans des systèmes hétérologues tels que les oocytes de *Xenopus* (Torrent et al., 1994, Planta 192, 512-518) et dans *Arabidopsis thaliana* (Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911-1922), indique que les polypeptides de  $\gamma$ -zéine 25 restent stables et sont capables en tant que tels de former des corps protéiques dérivés du réticulum endoplasmique, à l'intérieur des cellules. De plus, des analyses par délétion de différents domaines structuraux de la  $\gamma$ -zéine ont montré que la séquence N-terminale incluant le domaine répété riche en proline, était responsable de la rétention de la  $\gamma$ -zéine dans

le réticulum endoplasmique et que le domaine C-terminal riche en cystéine était responsable de la formation des corps protéiques. Le domaine Pro-X ne semblait pas en relation avec la stabilité de la protéine ni avec sa localisation ciblée (Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911-1922).

5    **Matériel et Méthodes**

**Matériel végétal**

Après une stérilisation en surface (1) des graines de stade 17 DAP ("days after pollination") du maïs de sélection W64A ont été disséquées à la main et la couche de péricarpe et d'aleurone a été séparée des endospermes. Des sections tangentielles ont été réalisées de façon à exposer une grande partie de la surface sub-aleuronique. Si nécessaire, des embryons ont été isolés et des feuilles de plantes âgées de 7 jours ont 10 été disséquées pour retirer le tissu épidermique. Après dissection, les échantillons ont été déposés dans des boîtes de Petri sur des papiers filtres humidifiés avec un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962, Physiol. 15, 473-497).  
15

20    **Constructions plasmidiques**

Un premier ensemble de plasmides, pKSG2, pHbP2, pPbP4 et pNaN1 a été obtenu pour permettre l'introduction de sites de restriction dans le gène codant pour la  $\gamma$ -zéine. pKSG2 et pHbP2 ont été construits 25 selon la description décrite dans la publication de Torrent M. et al. (Planta (1994) 192 : 512-518). Le plasmide pKSG2 contient la séquence codante de la  $\gamma$ -zéine.

Le plasmide pHbP2 est obtenu à partir de pKSG2 et contient une séquence codant pour une  $\gamma$ -zéine mutée dans laquelle le domaine Pro-X de la protéine a été déleté.

Le plasmide pPbP4 a été obtenu à la suite de deux étapes de clonage : (i) le fragment de restriction Sall-PvuII de 350 pb de pKSG2 a été cloné dans un plasmide Bluescript (pBSKS, Stratagene, La Jolla, California USA) restreint avec Sall et EcoRV (pKSC4) et (ii) le fragment de restriction PvuII-XbaI de 600 bp de pKSG2 a été cloné dans les sites de restriction SmaI-XbaI de pKSC4. La nouvelle construction pPbP4 contient un site de restriction utile EcoRI juste avant le domaine P-X de la séquence codante de la  $\gamma$ -zéine.

Le plasmide pNaN1 a également été obtenu à l'aide de deux étapes de clonage : (i) le fragment Nael-XbaI de 250 bp de pKSG2 a été cloné dans le plasmide pBSKS restreint avec EcoRV-XbaI (pKSC8) et (ii) le fragment de restriction Nael-HindIII de 700 bp (à extrémités franches) de pKSG2 a été cloné dans le site de restriction HindIII de pKSC8. La nouvelle construction, pNaN1, contient des sites de restriction ClaI et HindIII à une position située à 15 nucléotides avant le codon stop de la  $\gamma$ -zéine.

Deux oligonucléotides synthétiques répondant aux séquences suivantes : SEQ ID N°1 :

5'CGATGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCGAAGCCAAAAGAATTCA3', et sa séquence inverse appelée SEQ ID N°2, dont la séquence est la suivante :

25 5'AGCTTGAATTCTTTGGCTTCGGCTTGGCTTGGTTGAATTCAT3' codant pour des séquences riches en lysine désignées K(P-K)<sub>4</sub>, ont été hybridées, digérées avec EcoRI et clonées dans un site EcoRI de pHbP2 et pPbP4. Trois clones ont été sélectionnés : pPo2 et pHo3 contenant la séquence codante pour K(P-K)<sub>4</sub> et pHo4 comprenant la forme tronquée de

la séquence codant pour le  $\gamma$ -zéine contenant un tandem  $2K(P-K)_4$  (sous forme d'une séquence  $K(P-K)_4 EF K(P-K)_4$ ) de la séquence codante riche en lysine. Les mêmes oligonucléotides hybridés ont été digérés avec des enzymes Clal-HindIII et clonés dans le plasmide pNaN1 restreint à l'aide 5 des mêmes enzymes. Le clone sélectionné, pNo1, contenait la séquence codant pour la séquence riche en lysine  $K(P-K)_4$  à l'extrémité N-terminale de la  $\gamma$ -zéine modifiée correspondante.

Pour la transformation transitoire de l'endosperme, les séquences codant pour la  $\gamma$ -zéine modifiée de pPo2 et pHo3 ont été insérées sous la 10 forme de fragments HinclI-Nhel dans des sites SmaI-XbaI de pDH51 (Pietrzah et al., 1986, Nucl. Acid Res. 14, 5857-5868) contenant le promoteur 35S du virus de la Mosaïque du chou-fleur (CaMV). Le promoteur pP20 $\gamma$ Z obtenu par l'insertion décrite ci-dessus des fragments HinclI-Nhel dans les plasmide pDH51 contient la séquence codante de la 15  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine (Figure 8) ainsi que les signaux de la séquence 35S du virus CaMV pour la formation de l'extrémité 3' et la polyadénilation. La séquence codante chimère P20 $\gamma$ Z a été construite à partir de la région codante de la  $\gamma$ -zéine contenu dans le plasmide pKSG2 après différentes étapes de clonage. Le promoteur de 1,7 kb de la  $\gamma$ -zéine (Reina et al. 20 1990, Nucl. Acids Res. 18, 6426) a été inséré dans les extrémités franches d'un fragment HindII-PvuI dans pHo4 et pNo1 restreints avec XhoI et obtenus avec des extrémités franches. Les constructions pH45 $\gamma$ Z et pN13 $\gamma$ Z ont respectivement été obtenues.

Les nouvelles constructions, respectivement appelées pP20 $\gamma$ -Z, 25 pH30 $\gamma$ Z, pH45 $\gamma$ Z et pN13 $\gamma$ Z ont été utilisées dans des expériences de bombardement biolistique.

Pour étudier la spécificité de différents promoteurs vis-à-vis des tissus végétaux, deux constructions, p1.7 $\gamma$ ZGUS et pCaMV35SLUC ont été utilisées. p1.7 $\gamma$ ZGUS a été obtenue par insertion du promoteur de la  $\gamma$ -

zéine de 1,7 kb (HindIII-PvuI) dans un plasmide dérivé de pPuC18 contenant le gène GUS et les signaux NOS de polyadénilation en 3' de pBI 101.1 (Jefferson et al., 1987, Embo. J. 6, 3901-3907). pCaMV35SLUC a été obtenu par insertion du gène codant pour la luciférase (LUC) de pAHC18 (Bruce et al., 1989, P. H. 86, 9692-9696) dans le polylinker de pDH51 (Pietrzak et al., 1986, Nucl. Acids Res. 18, 6426).

### **Analyse in-vitro**

10 Les plasmides dérivés de pBSKS contenant les séquences codantes de la  $\gamma$ -zéine (pKSG2) et de la  $\gamma$ -zéine riche en lysine (pPo2, pHo3, pHo4 et pNo1) ont été transcrits in-vitro suivant les protocoles standards (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Ed., Cold Spring Harbor, New York). Une traduction in-vitro et une translocation des transcrits synthétiques ont été réalisées selon la technique de Torrent et al., (1994, Panta 192, 512-518), à l'exception des microsomes canins (CM) utilisés qui provenaient de Promega (Madison, Wis., USA). L'immunoprecipitation des produits traduits a été effectuée essentiellement selon la méthode de Borgese et Gaetani (1980) en utilisant un sérum de lapin anti- $\gamma$ -zéine $\alpha$ -G2, (Ludevid et al., 1985, Plant Sci. 41, 41-48) et un antisérum  $\alpha$ PL.  $\alpha$ PL est un antisérum polyclonal de lapin obtenu contre le peptide synthétique EFK(P-K)<sub>8</sub>EF. Ce peptide a été synthétisé en utilisant la technique de synthèse en phase solide décrite par Celma et al., 1992.

15

20

25

### **Bombardement de microparticules**

L'ADN plasmidique a été absorbé sur des particules d'or (1,0  $\mu$ m, Bio-Rad, Lab., Richmond, CA, USA) selon un protocole décrit par Kikkert

(Plant Cell, 33:221-226, 1993). Toutes les cibles ont été bombardées deux fois, en utilisant le dispositif BioRad Biolistic PDS-1000/He. Les cibles ont été positionnées 8 cm derrière un écran stoppant les macroporteurs, qui étaient positionnés 1 cm au dessous du disque de rupture 900 PSI. Après 5 le bombardement, les échantillons ont été incubés pendant 24 heures à 26°C dans le noir. Des témoins étaient constitués par les cibles bombardées avec des microprojectiles dépourvus d'ADN.

### Tests enzymatiques

10

Les tissus bombardés avec les plasmides p1.7 $\gamma$ ZGUS et pCaMV35SLUC ont été homogénéisés sur de la glace dans un tampon contenant 25mM Tris, à pH 7,8, 2mM DTT, 10% de glycérol et 1% de Triton X-100. Après centrifugation à 12.000xg pendant 5 minutes, les 15 surnageants ont été décantés et la protéine soluble totale dans les extraits a été quantifiée en utilisant le test Bradford (Bio-Rad). L'activité GUS a été testée par analyse fluorimétrique selon la description de Jefferson (1987) en utilisant la 4-méthyl-ombelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) en tant que substrat. L'activité LUC a été déterminée en utilisant le système de test 20 Luciferase (Luciferase Assay System Kit) diffusé par Promega, selon les instructions du fabricant.

### Extraction des protéines de réserve et analyse sur gel des protéines

25

Des endospermes transformés avec pP20 $\gamma$ Z, pH20 $\gamma$ Z, pH45 $\gamma$ Z et pN13 $\gamma$ Z ont été réduits à l'état de farine et les  $\alpha$ -zéines ont été extraites à l'aide de trois séries de solvants contenant 70% d'éthanol. La farine résiduelle a été séchée à l'air, et les protéines totales ont été extraites avec un tampon contenant 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% sodium dodecyl

30

sulfate (SDS) et 5% 2-mercptoethanol, pendant 1 heure à température ambiante. Les extraits de protéines ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot selon la description de Ludevid et al., 1985. Des feuilles de nitrocellulose ont été intubées avec de l'antisérum  $\alpha$ PL (dilution 1:500) et 5 de la peroxidase de Raifort conjuguée avec un anticorps secondaire (ECL Western Blotting System, Amersham, Buckinghamshire, UK) a été utilisée pour la détection de la protéine.

#### Analyse de l'expression de l'ARN

10

L'ARN total a été extrait selon la description de Logemas et al., 1987. L'ADN complémentaire (ADNc) a été préparé en utilisant la transcriptase réverse et l'oligo dT de Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) selon les instructions du fabricant et cet ARN a été amplifié par une 15 réaction de PCR. Des oligonucléotides amorces utilisées pour la PCR étaient des séquences de 20-mers correspondant aux extrémités de 5' et 3' du gène de structure de la  $\gamma$ -zéine. Des protocoles standards ont été utilisés pour la préparation de sondes marquées au  $^{32}$ P, et pour l'analyse sur gel de l'ADN (Sambrook et al. Molecular Cloning: A laboratory manual, 20 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Ed., Cold Spring Harbor, New York) en utilisant un oligonucléotide synthétique codant pour une séquence riche en lysine (voir ci-dessus) en tant que sonde.

#### Isolement des corps protéiques et traitement par la protéase

25

Ces protocoles ont été décrits antérieurement (Torrent et al., Planta, 180: 90-95, 1989).

#### Microscopie électronique

Les corps protéiques des endospermes de type sauvage et des endospermes transformés par pP20 $\gamma$ Z ont été fixés avec 2,5% de paraformaldéhyde dans 20 mM de tampon phosphate à pH7,2, pendant 1  
5 heure à température ambiante, et transformés selon la description de Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911-1922) toutefois en utilisant un antisérum  $\alpha$ -PL et un colloïde d'or et de protéine A ayant un diamètre de 15 nm. Pour le marquage double, des sections ultra fines ont été d'abord incubées avec  $\alpha$ -PL et le colloïde d'or et de protéine A (15 nm de diamètre) a été utilisé  
10 pour la détection de l'anticorps. Après lavage, des sections ont été incubées avec 0,15 mg/mL de protéines A pendant 20 minutes pour saturer les immunoglobulines et finalement les grilles ont été incubées avec des séra  $\alpha$ -G2 ou  $\alpha$ -Z1 et le colloïde or/protéine A (diamètre 5 nm) a été utilisé pour la détection de l'anticorps.  $\alpha$ -Z1 est un antisérum polyclonal  
15 de lapin dirigé contre l' $\alpha$ -zéine obtenu selon la description de Ludevid et al., 1985, Plant Sci. 41, 41-48).

### Résultats

#### 20 Construction des $\gamma$ -zéines riches en lysine

Les inventeurs avaient démontré l'importance du domaine répété riche en proline ("proline-rich repeat") et du domaine C-terminal riche en cystéine pour la rétention dans le réticulum endoplasmique de la  $\gamma$ -zéine et  
25 la formation des corps protéiques contenant ces protéines dans les cellules de feuilles de Arabidopsis (Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911-1922). Sur la base de ces résultats préalables, la possibilité d'insérer des séquences riches en lysine dans différents domaines de la  $\gamma$ -zéine, de façon à créer une  $\gamma$ -zéine modifiée correctement ciblée et accumulée dans

les cellules de l'endosperme a été investiguée afin d'améliorer les qualités nutritives du maïs.

Les inventeurs ont à présent construit des gènes modifiés de la  $\gamma$ -zéine par introduction d'oligonucléotides synthétiques codant pour des séquences riches en lysine dans différents sites de la séquence codante de la  $\gamma$ -zéine. Des constructions de  $\gamma$ -zéine modifiée ont été créées de façon à éviter le placement des séquences codantes riches en lysine dans les domaines constitués par le domaine répété en tandem et le domaine riche en cystéine. Des modifications de la séquence codante de la  $\gamma$ -zéine ont été effectuées dans la séquence correspondant au domaine Pro-X. De plus pour minimiser une altération du repliement de la protéine, les séquences riches en lysine ( $P-K)_n$  ont été définies pour imiter la séquence du domaine Pro-X. Comme on le voit sur la figure 3, dans la protéine P20 $\gamma$ Z, une séquence K( $P-K)_4$  a été introduite après la région Pro-X et dans la protéine H30 $\gamma$ Z et dans la protéine H45 $\gamma$ Z, des séquences d'acides aminés comprenant K( $P-K)_4$  et 2K( $P-K)_4$  respectivement remplacent le domaine Pro-X de la  $\gamma$ -zéine ( $\gamma$ Z, Fig. 3). Pour explorer si l'extrémité C-terminale était un site permissif pour l'introduction des séquences riches en lysine, une protéine supplémentaire N13 $\gamma$ Z, a été créée par l'insertion d'une séquence contenant K( $P-K)_4$  cinq acides aminés en amont de l'extrémité C-terminale (Fig.3).

#### Activité du promoteur de la $\gamma$ -zéine dans l'endosperme de maïs transformé

Pour déterminer si des  $\gamma$ -zéines riches en lysine pouvaient être exprimées dans les cellules de l'endosperme, on a tout d'abord recherché un promoteur efficace et un système de transformation. Un promoteur de la  $\gamma$ -zéine, contenant une séquence en amont de 1,7 Kb (Reina et al., 1990, Nucleic Acid Research, vol. 18, p. 6426) et le promoteur CaMV contenant

625 bp de la séquence en amont de la protéine 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur CaMV ont été testés. Jusqu'à présent aucune information n'était disponible sur l'analyse fonctionnelle des fusions de gènes avec le promoteur de la  $\gamma$ -zéine dans les plantes monocotylédones 5 transgéniques. Pour analyser l'activité et la spécificité tissulaire du promoteur de la  $\gamma$ -zéine, deux gènes chimères ont été construits (voir Fig. 5). L'expression transitoire par bombardement biolistique (Klein et al., 1988 PNAS 85:4305) a été utilisée comme procédure de transformation du maïs pour l'analyse du promoteur aussi bien que pour des expériences 10 d'expression des  $\gamma$ -zéines riches en lysine. Des endospermes de maïs de stade 17 DAP (17 jours après la pollinisation) (le péricarpe et les cellules de la couche aleuroniques étaient enlevés), des embryons (17 DAP) et des jeunes feuilles (âgées de 10 jours) ont été bombardés avec des projectiles 15 d'or recouverts avec de l'ADN plasmidique contenant les deux constructions. La figure 5 montre les activités de  $\beta$ -glucuronidase (GUS) et de luciférase (LUC) présentes dans les trois tissus testés : l'endosperme, l'embryon et la feuille, par rapport à l'expérience témoin. On doit noter que les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées. Toute l'activité GUS sous le contrôle du 20 promoteur de la  $\gamma$ -zéine était restreinte à l'endosperme, puisque aucune expression GUS n'a été détectée dans l'embryon et dans les feuilles. De plus, les endospermes bombardés ont été colorés histochimiquement pour déterminer le nombre de clusters cellulaires exprimant la protéine GUS. Le profil de coloration corroborait les résultats précédents, GUS était 25 fortement exprimé dans les endospermes (le nombre moyen de clusters cellulaires colorés pour GUS par endosperme était de 150) et des tâches bleues n'ont pas été détectées dans l'embryon et dans les feuilles. Au contraire, le promoteur CaMV 35S conférait une activité LUC dans tous les tissus testés (Fig. 5), mais il existait cependant des différences

quantitatives entre l'activité relative de l'enzyme dans les feuilles et les embryons par rapport à l'endosperme. Ces différences pouvaient être attribuées à une variabilité intrinsèque de l'activité constitutive du promoteur CaMV parmi les différents tissus du maïs ou à une pénétration 5 faible des particules recouvertes par l'ADN dans les cellules mésophyles contenant un système vacuolaire important. Il existe dans l'état de la technique des preuves selon lesquelles le promoteur CaMV aurait habituellement une faible activité dans des cellules de plantes monocotylédones (Fromm et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 10 5824-5828) ; cependant les inventeurs ont montré ici une forte activité du promoteur CaMV dans des cellules d'endospermes. Ceci a permis de conclure que l'activité du promoteur de la  $\gamma$ -zéine et du promoteur CaMV 35S était très forte dans les endospermes de maïs et ainsi que les deux promoteurs pouvaient s'avérer utiles pour contrôler l'expression de la 15 protéine dans ce tissu.

Pour déterminer si les protéines mutantes codées par les constructions étaient compétentes avec la fonction de translocation membranaire, des expériences de transcription-traduction in-vitro ont été effectuées en présence de microsomes pancréatiques de chien. Les 20 transcrits synthétiques de chaque construction ont été traduits et la translocation à travers les membranes de microsomes testée par recherche de la protection vis-à-vis de la digestion par la protéinase K. Ces résultats rapportés à la figure 4A indiquent que les poids moléculaires apparents des polypeptides synthétisés in-vitro reflètent les mutations 25 introduites (Fig. 4A, lignes 1, 5, 9 et 13). En présence des microsomes et de la protéinase K, des peptides de faible poids moléculaire n'ont pas été observés, indiquant que les chaînes polypeptidiques complètes des  $\gamma$ -zéines modifiées étaient transportées à travers les membranes microsomales (Fig. 4A, lignes 3, 7, 11 et 15). En comparant le résultat de 30 la translocation des quatre  $\gamma$ -zéine modifiées, on a observé que la protéine

H45 $\gamma$ Z (Fig. 4A, ligne 11), qui contenait l'insertion de 10 acides aminés de type lysine, a subi une translocation inférieure aux autres protéines. Il semble que les résidus chargés négativement pourraient interférer dans une certaine proportion, sur l'efficacité de la translocation. L'anticorps 5 polyclonal  $\alpha$ G2, dirigé contre la  $\gamma$ -zéine (Ludevid et al., 1985, Plant Sci. 41, 41-48) ne pouvant être utilisé pour distinguer entre la  $\gamma$ -zéine de type sauvage et les  $\gamma$ -zéines modifiées, un anticorps  $\alpha$ PL dirigé contre un peptide synthétique contenant la séquence d'acides aminés riche en lysine a été préparé. On a ensuite testé si des protéines modifiées synthétisées 10 in-vitro étaient reconnues à la fois par les anticorps  $\alpha$ G2 et les anticorps  $\alpha$ PL. Cette expérience est illustrée à la figure 4B et la figure 4C où les transcrits synthétiques de la  $\gamma$ -zéine, P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z, H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z étaient traduits in-vitro et dans lesquels les produits de traduction étaient immunoprécipités avec  $\alpha$ PL (Fig. 4B) et avec  $\alpha$ G2 (Fig. 4C). Ces résultats 15 indiquent que les  $\gamma$ -zéines riches en lysine étaient reconnues par les deux anticorps (voir Fig. 4B et C, lignes 2 à 5) et que la  $\gamma$ -zéine était seulement reconnue par le sérum  $\alpha$ G2 (Fig. 4B et C, ligne 1). Ainsi la spécificité des anticorps  $\alpha$ PL pour les protéines modifiées a permis de distinguer la  $\gamma$ -zéine riche en lysine de la  $\gamma$ -zéine endogène lorsque les gènes modifiés 20 étaient exprimés dans des cellules d'endosperme. Prises ensemble ces expériences ont montré que la présence de séquences riches en lysine ne perturbait pas la fonction de translocation à travers la membrane ou le comportement immunologique de la  $\gamma$ -zéine.

25 Analyse de l'expression des  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine dans les endospermes de maïs

Pour explorer si la  $\gamma$ -zéine modifiée riche en lysine était exprimée et accumulée dans les cellules de l'endosperme, des graines de stade 17

DAP ont été bombardées avec l'ADN contenant les séquences codant pour la protéine des quatre constructions (Fig. 3) sous le contrôle du promoteur CaMV (P20 $\gamma$ Z et H20 $\gamma$ Z) et du promoteur de la  $\gamma$ -zéine (H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z). Des constructions comprenant des promoteurs anti-sens ou dépourvues de 5 promoteurs ont été utilisées comme témoins. Après 24 heures de transformation des endospermes, les protéines totales ont été extraites et l'expression des  $\gamma$ -zéines modifiées a été testée par immunoblotting en utilisant l'anticorps  $\alpha$ PL. La figure 6A montre que les gènes chimères de  $\gamma$ -zéine contenant l'insertion (Pro-Lys)<sub>n</sub> après le domaine Pro-X (P20 $\gamma$ Z) ou le 10 remplaçant (H45 $\gamma$ Z et H30 $\gamma$ Z) étaient fortement exprimés et les produits de traduction accumulés efficacement dans les cellules de l'endosperme (Fig. 6A, lignes 3, 4 et 5). Pour chaque ligne, les extraits de protéine correspondaient à 1/3 environ d'un endosperme bombardé, ce qui a permis 15 d'estimer que la quantité de protéines modifiées P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z et H45 $\gamma$ Z par endosperme atteignait le niveau du nanogramme. De plus, aucune différence quantitative entre les niveaux d'expression des gènes chimères sous le contrôle du promoteur CaMV et du promoteur de la  $\gamma$ -zéine n'a été observée, confirmant les résultats ci-dessus décrits obtenus avec les protéines marqueurs GUS et LUC (Fig. 5). On a noté que l'anticorps  $\alpha$ PL 20 reconnaissait une protéine d'environ 30 kD présente dans les extraits de protéine totale, même dans les endospermes non transformés (voir la bande faible présente dans les quatre lignes de la figure 6A). Une procédure d'extraction séquentielle de protéine a permis de constater que 25 cette protéine n'était pas une protéine de réserve soluble dans un milieu aqueux.

Comme le montre la figure 6A (ligne 2) aucune trace de la protéine N13 $\gamma$ Z n'a été détectée, indiquant que le gène chimère correspondant n'était pas exprimé dans les cellules de l'endosperme ou que la protéine N13 $\gamma$ Z était dégradée. Des ARNs des endospermes transformés avec les

ADNs codant pour les protéines H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z ainsi que les ARNs des endospermes non transformés ont été analysés. A partir des ARNs totaux, les ADNc ont été préparés et amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques. La Fig. 6B montre l'analyse en Southern blot de trois échantillons d'ADNc hybridés avec un oligonucléotide codant pour une séquence K(Pro-Lys)<sub>4</sub> utilisée comme sonde. Les résultats indiquent que le gène N13 $\gamma$ Z était correctement exprimé (Fig. 6B, ligne 3). La présence de bandes dans les échantillons H45 $\gamma$ Z et N13 $\gamma$ Z, mais pas dans les endospermes non transformés, a suggéré que la protéine N13 $\gamma$ Z était dégradée pendant les 24 heures de l'incubation. A partir de ces observations, les inventeurs ont conclu que le site d'insertion des séquences riches en lysine était critique pour la stabilité de la  $\gamma$ -zéine modifiée.

15 La  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine est accumulée dans le corps protéiques

En dehors de la teneur en lysine des séquences Pro-X, les protéines P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z et H45 $\gamma$ Z avaient des caractéristiques communes avec la  $\gamma$ -zéine de type sauvage : le peptide signal, le domaine répété en tandem N-terminal et la région riche en cystéine C-terminale étaient apparentées. Il a semblé important de déterminer si ces domaines restaient totalement fonctionnels préservant le ciblage et la formation des corps protéiques ou si les séquences riches en lysine créaient un environnement spécial dans lequel ces propriétés pouvaient être perturbées. Pour tester ceci, on a investigué si les  $\gamma$ -zéines modifiées étaient capables de s'accumuler dans les corps protéiques. Un fractionnement sub-cellulaire a été réalisé avec les endospermes transformés. Les homogénats d'endospermes bombardés ont été chargés sur des gradients de sucre discontinus (20 %, 50 % et 70 % de sucre)

et toutes les fractions collectées ont été analysées par immunoblotting. P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z et H45 $\gamma$ Z sédimentés sur la fraction des corps protéiques et aucune quantité significative de ces protéines n'a été détectée, soit dans le surnageant, soit dans la fraction microsomale (Fig. 7A, lignes 2, 2 et 3).

5 Bien que dans les expériences faites préalablement in-vitro (Fig. 4A) aient permis de constater que les  $\gamma$ -zéines modifiées nouvellement synthétisées subissaient une translocation dans les microsomes canins, on a testé ici si les protéines modifiées exprimées in-vivo dans des cellules d'endosperme, subissaient une translocation dans la membrane du réticulum

10 endoplasmique et restaient à l'intérieur des corps protéiques dérivés du réticulum endoplasmique. Pour cette raison, des corps protéiques isolés ont été soumis à une digestion par la protéinase K dans des tampons isotoniques (contenant 20 % de sucre) ou après un choc osmotique dans l'eau (Fig. 7B). Les protéines protégées contre la dégradation

15 protéolytique par des enzymes peuvent être entourées par une membrane et un traitement par des solutions détergeantes ou hypotoniques a résulté dans la digestion des protéines (Walter et Blobel, 1983, Method Enzymol. 96, 84-93). Une comparaison des intensités de bandes, après digestion par la protéinase K dans des milieux comprenant du sucre ou de l'eau, a permis de révéler que les protéines P20 $\gamma$ Z, H30 $\gamma$ Z et H45 $\gamma$ Z étaient

20 protégées de la digestion dans des tampons isotoniques (lignes 1, 3 et 5) mais étaient partiellement digérées dans l'eau (lignes 2, 4 et 6).

L'expression des gènes modifiés de la  $\gamma$ -zéine dans les cellules de la couche du sub-aleurone de l'endosperme par bombardement biolistique

25 a permis d'observer que des  $\gamma$ -zéines riches en lysines étaient largement accumulées à l'exception du cas où les séquences riches en lysine étaient positionnées 5 résidus en amont de l'extrémité C-terminale du polypeptide de la  $\gamma$ -zéine. A partir de cette expression et d'études immunocytochimiques sur des corps protéiques isolés, les inventeurs ont

démontré que des  $\gamma$ -zéines riches en lysine sont correctement accumulées dans ces organites et sont co-localisées avec les protéines endogènes  $\gamma$ -zéine et  $\alpha$ -zéine.

Des corps protéiques isolés à partir des endospermes P20 $\gamma$ Z ont été examinés par marquage de type immunogold et microscopie électronique. Sur des sections ultra fines incubées avec l'anticorps  $\alpha$ P-L (Fig. 8A), le marquage à l'or a été détecté à l'intérieur des corps protéiques, indiquant que la protéine P20 $\gamma$ Z riche en lysine était accumulée à l'intérieur de ces organites. Dans des sections incubées seulement avec l'anticorps  $\alpha$ P-L, l'immunomarquage avait lieu uniquement sur quelques corps protéiques (contenant la  $\gamma$ -zéine riche en lysine), la plus grande partie des corps protéiques isolés n'était pas immunomarquée avec des anticorps  $\alpha$ P-L parce qu'ils correspondaient à des cellules d'endosperme non transformées. Pour déterminer si la  $\gamma$ -zéine riche en lysine était co-localisée avec les polypeptides  $\alpha$ -zéines et  $\gamma$ -zéines, un double marquage en immuno-électromicroscopie a été réalisé sur des corps protéiques isolés en utilisant les anticorps  $\alpha$ Z et  $\alpha$ P-L (Fig. 8B) et  $\alpha$ G2 et  $\alpha$ P-L (Fig. 8C et D). La figure 8B montre une micrographie de la section transversale de deux corps protéiques marqués avec l'anticorps  $\alpha$ P-L (particule d'or de 15 nm) et avec l'anticorps  $\alpha$ Z (particule d'or de 5 nm). Le résultat de l'immunocoloration a montré que la protéine P20 $\gamma$ Z est accumulée dans les corps protéiques et co-localisée avec l' $\alpha$ -zéine (voir l'étendue du marquage de l' $\alpha$ -zéine sur toute la surface du corps protéique). Par ailleurs, des sections tangentialles (Fig. 8B, voir les flèches) et transversales (Fig. 8D) des corps protéiques ont été incubées avec l'anticorps  $\alpha$ P-L (particule d'or 15 nm) et avec l'anticorps  $\alpha$ G2 (particule d'or de 5 nm). Dans les deux cas, la protéine P20 $\gamma$ Z était co-localisée avec les polypeptides  $\gamma$ -zéines. On a pu noter que les sections tangentialles du corps protéique (Fig. 8A, C, voir les flèches) étaient

facilement distinguées des sections transversales du corps protéique dans la mesure où les premiers présentaient une densité plus forte en électrons et que le marquage de la  $\gamma$ -zéine était étendu sur toute la section. Au contraire les sections transversales présentaient une densité inférieure et 5 le marquage de la  $\gamma$ -zéine était localisé sur la membrane entourant le corps protéique. Dans les deux cas, la localisation du marquage de la  $\gamma$ -zéine riche en lysine suivait celle de la  $\gamma$ -zéine endogène.

10      **B)    Préparation de plantes génétiquement modifiées, exprimant des  $\gamma$ -zéines riches en lysine**

1)    **Obtention et utilisation de cal de maïs comme cible pour la transformation génétique.**

15      La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (electroporation; Agrobacterium, microfibres, canon à particules) requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de 20 maïs.

Ces calcs sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype Hi II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (Maize Handbook ; (1994) M. Freeling, V. Walbot Eds ; pp 665-671). Les calcs ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages 25 successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces calcs en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al. (Plant Cell Tissue and Organ Culture (1989) 18 : 143-

151). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

2) Utilisation du canon à particules pour la transformation  
5 génétique du maïs.

Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires nécessaires à la transformation ; on décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules identique à celui décrit par J. Finer (Plant Cell Report (1992) 11 :323-328) ; les cellules cibles sont des fragments des cals décrits dans le paragraphe 1. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> ont été disposés, 4h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de petri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2M de sorbitol. Les plasmides portant les gènes à introduire sont purifiés sur colonne Qiagen® en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (Nature (1987) 327 :70-73). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrits par J. Finer (Plant Cell Report (1992) 11 : 323-328).

Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé (voir paragraphe 3). Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés

actifs de certains herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...).

On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélectif, habituellement et 5 majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de 10 façon à régénérer des plantules (cf. paragraphe 1). Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

15

3) Utilisation du gène Bar pour la production plantes de maïs génétiquement modifiées ayant incorporé et exprimant le gène H45yZ

Le gène Bar de *Streptomyces hygroscopicus* code pour une 20 phosphinotricine acyl transférase (PAT) qui inactive par acetylation la phosphinotricine-molécule active de l'herbicide Basta®. Les cellules portant ce gène sont donc rendues résistantes à cet herbicide et peuvent être sélectionnées par son intermédiaire. Pour la transformation des céréales la séquence codante du gène Bar est sous le contrôle d'une 25 région régulatrice permettant une expression forte et constitutive dans les cellules végétales. Une telle région est avantageusement constituée par le promoteur et le premier intron du gène Actine de riz tels que décrits par Mc Elroy (Mol. Gen. Genet. (1991) 231 : 150-160).

Ce gène chimérique est cloné sur un plasmide permettant son 30 amplification par *Escherichia coli*. Ce plasmide (pDM 302 Cao (Plant Cell

Report (1992) 11:586-591) après amplification puis purification sur colonne Qiagen® peut être utilisé en transformation génétique du maïs en utilisant par exemple la méthode décrite dans l'exemple précédent. Dans ce cas les milieux de culture destinés à la sélection des cellules transformées sont 5 additionnés de 2 mg/L de Phosphinotricine.

Pour l'introduction du gène H45γZ une technique dite de cotransformation est avantageusement utilisée : les gènes de sélection (Bar) et d'intérêt (H45γZ) sont portés par des plasmides indépendants. Dans le cas de l'utilisation du canon à particules on procéde à une 10 coprécipitation des plasmides sur les particules de tungstène, la quantité totale d'ADN précipité sur les particules restant identique à ce qu'elle est dans le protocole standard (5µg d'ADN pour 2,5 mg de particules) chaque plasmide représentant environ la moitié du poids total d'ADN utilisé.

L'expérience montre qu'avec cette méthode, la cointégration des 15 plasmides dans les cellules végétales est l'événement le plus fréquent (de l'ordre de 90%) c'est-à-dire que pratiquement chaque plante ayant intégré le gène Bar et sélectionnée par son intermédiaire portera aussi le gène H45γZ. Le niveau de coexpression (pourcentage de plantes sélectionnées exprimant le gène H45γZ) est habituellement de l'ordre de 70%.

20 Les gènes ainsi introduits sont généralement liés au sens génétique, le gène H45γZ peut ainsi avantageusement être suivi dans les descendances grâce à la résistance à l'herbicide qui lui est étroitement associée.

La quantité de protéine modifiée est déterminée par les méthodes 25 décrites dans l'exemple A, notamment par immunoblotting sur extraits protéiques de grains de maïs immatures ou matures, prélevés en pool sur des plantes résistantes au BASTA.

4) Exemple explicitant l'étape d'introduction des transgènes et notamment du gène codant pour la H45 $\gamma$ Z, pour la modification du phénotype opaque 2 du maïs

5 Amélioration de maïs opaque 2 par l'introgression du gène de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine.

Les plantes transformées décrites dans l'exemple précédent, présentent à la fois, une résistance au Basta et l'expression d'une  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine sont utilisées. Leur pollen est utilisé pour féconder les 10 plantes de maïs opaque 2 de la lignée W64Ao2 qui ne contient qu'un seul gène  $\gamma$ -zéine. Cette lignée a été obtenue auprès du Maize Stock Center. Les plantes de ces descendances F1 sont sélectionnées pour leur résistance au Basta et ensuite autofécondées. Les graines F2 ainsi produites sont analysées pour le phénotype opaque sur une table 15 lumineuse et les grains opaque ou les grains vitreux sont semés et évalués pour la résistance au Basta. Dans le cas où tous les grains opaques sont sensibles au Basta, la démonstration est faite que l'introduction du gène  $\gamma$ -zéine enrichi en lysine dans la plante considérée, complémente le phénotype opaque 2.

20 Dans un deuxième temps, dans ces plantes Basta résistantes, des individus de génotype o2/o2 et ne possédant qu'un seul gène  $\gamma$ -zéine sur le chromosome 7 sont sélectionnés à l'aide des sondes moléculaires codant pour le gène Opaque 2 et pour la  $\gamma$ -zéine. Ces dernières révélant des fragments de restriction polymorphes et seuls les individus présentant 25 le patron type de la lignée W64o2 sont retenus (Lopes M.A. et al, 1995, Mol. Gen. Genet. 19 : 247, 603-613).

Ces individus ont un contenu en lysine qui est en moyenne équivalent à celui du maïs o2, voire supérieur. A partir de ces individus, toute introgression dans des variétés ELITE, du caractère « forte teneur en

lysine » est observée via la détermination de la résistance au BASTA et de la présence de l'allèle o2 détectée par RFLP.

5) Expression de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine dans *Arabidopsis thaliana*.

5

Pour obtenir une transformation stable, les constructions plasmidiques P20 $\gamma$ Z et pH30 $\gamma$ Z clonées dans le plasmide Bluescript KS (-) ont été insérées sous forme de fragments HincII/XbaI dans le vecteur binaire pBin19 (Bevan, M. Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721 (1984)), 10 contenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et les signaux de formation de l'extrémité 3' et de polyadénylation du gène de l'octopine synthétase (ocs). Les nouveaux plasmides ont été appelés p19P20 $\gamma$ Z et p19H30 $\gamma$ Z (figure 12).

Les vecteurs binaires contenant les séquences codant pour les protéines P20 $\gamma$ Z et H30 $\gamma$ Z (p19P20 $\gamma$ Z et p19H30 $\gamma$ Z) ont été transférés dans la souche LBA4404 d'Agrobacterium tumefaciens. Des plantes Arabidopsis ecotype RLD ont été transformées selon la méthode décrite par Valvekens, D., Van Montagu, M. et Van Lijsebettens, M. ((1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5536-5540). Pour chaque construction, 10 plantes 20 transgéniques ont été ciblées par analyse en immunoblot en utilisant un antisérum obtenu contre la  $\gamma$ -zéine ( $\alpha$ G2, Ludevid et al. 1985). Les plantes contenant les taux les plus élevés (correspondant à environ 0,1% de la quantité totale de protéines présentes dans les feuilles d'*Arabidopsis*) de produits transgéniques dans la génération F1, ont été choisies pour obtenir 25 la génération F2. Ces plantes ont également été sélectionnées pour l'expression de la protéine recherchée.

Des plantes transgéniques entières, sélectionnées dans un milieu contenant de la kanamycine ont été homogénéisées dans de l'azote liquide. Les protéines transgéniques ont été extraites sélectivement avec

une solution contenant de l'éthanol/ de l'acide chlorhydrique HCl 0,125 N dans une proportion de 3:1 (v/v), avec 5% de mercaptoéthanol et d'inhibiteurs de protéase. Les protéines extraites avec cette solution ont été précipitées dans 5 volumes d'acétone et analysées par SDS-PAGE et 5 immunoblotting. Les extraits protéiques des plantes non transgéniques ont été utilisés en tant que contrôles. Les protéines résultant de l'insertion des séquences K(P-K)<sub>4</sub> dans la  $\gamma$ -zéine ont été exprimées correctement dans les plantes Arabidopsis thaliana en utilisant le promoteur constitutif 35 S du CaMV. Sur les immunoblots, les anticorps  $\alpha$ G2 et  $\alpha$ PL reconnaissaient 10 des bandes d'électrophorèse correspondant aux protéines P20 $\gamma$ Z et H30 $\gamma$ Z. Ces bandes migraient avec des masses moléculaires apparentes conformes à celles que l'on avait préalablement observées dans les expériences de traduction / translocation in vitro (30 kD et 26 kD respectivement). Comme on l'a observé dans les plantes transgéniques 15 Arabidopsis exprimant la  $\gamma$ -zéine (Geli et al. Plant Cell 6: 1911-1922 (1994)), les protéines P20 $\gamma$ Z et H30 $\gamma$ Z migraient sous la forme de deux bandes d'électrophorèse à savoir les bandes correspondant à 36 et 30 kD pour P20 $\gamma$ Z et les bandes correspondant à 32 et 26 kD pour H30 $\gamma$ Z. Les bandes supérieures pourraient correspondre à des produits ayant subi des 20 modifications post-traductionnelles. Une telle modification post-traductionnelle n'a pas été détectée dans les endospermes de maïs transformés. Ce résultat suggère que la modification apparaîtrait lorsque ces protéines sont exprimées dans un système hétérologue tel que Arabidopsis thaliana.

25

6) Expression de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine recombinantes dans du maïs.

Méthode:

Après obtention des plantes transgéniques, on les croise avec une lignée mâle non transformée. Par conséquent, 50% des grains récoltés dans ce cas d'insertion unilocus seront transgéniques. Dans le but d'analyser les  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine dans les plantes transgéniques,

5 les protéines sont extraites à partir de 6 grains par transformant.

Les endospermes sont disséqués en retirant des grains les embryons et les pericarpes. Les endospermes sont broyés et 50mg de farine sont utilisés pour l'extraction sélective. Préalablement les  $\alpha$ -zéines sont extraites par 3 traitements avec de l'éthanol à 70%. Après

10 centrifugation, l'éthanol est évaporé sous vide. Les protéines insolubles dans l'éthanol (principalement les  $\gamma$ -zéines et les  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine) sont extraites du culot avec un tampon de Laemli contenant 10% de mercaptoéthanol (100 $\mu$ l de tampon pour 10mg de farine). Les protéines totales sont ensuite analysées par coloration à l'argent (Morrissey J.H.

15 1981, Ann. Biochem. vol. 117, p. 307-310). Les  $\gamma$ -zéines et les  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine sont analysées par immunoblot en utilisant respectivement les anticorps  $\alpha$ G2 (dilution 1/2000) et  $\alpha$ PL (dilution 1/500). Un anticorps anti-anticorps de lapin conjugué à la phosphatase alcaline est utilisé comme anticorps secondaire dans l'immunoblot. Les extraits sont

20 dilués pour permettre leur chargement sur SDS-page selon la méthode analytique utilisée.

Résultats:

Accumulation de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine dans les plants 20 $\gamma$ Z et 45 $\gamma$ Z de maïs transgénique;

25 La figure 13 montre l'immunoblot des extraits de protéines révélées avec l'antisérum  $\alpha$ PL (A,B) et les protéines totales après coloration à l'argent (C). Comme on peut le voir dans la fig13A, 6 plants transgéniques 20 $\gamma$ Z ont été testés avec l'antisérum  $\alpha$ PL et de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine est exprimée dans les plants transgéniques A1 et D2 (pistes 1 et 6

respectivement). Dans le plant C1 (piste 4), seules des traces de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine sont observées. Lorsque les extraits des 6 plants transgéniques 45 $\gamma$ Z sont chargés sur le gel et marqués avec l'antisérum  $\alpha$ PL (Fig 13B), on observe une forte réaction avec l'anticorps pour les 5 transformants B1 et C1 (pistes 3 et 4 respectivement).

Il faut noter que la réaction avec l'anticorps dans les extraits des endospermes des plants 45 $\gamma$ Z B1 et C1 est plus forte que dans les extraits des plants 20 $\gamma$ Z A1 et D2. Ce résultat est confirmé après coloration à l'argent des gels (fig 13C) où les 2 types de  $\gamma$ -zéine : endogène et enrichie 10 en lysine, sont colorés. La  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine a un poids moléculaire apparent de 30kDa et la  $\gamma$ -zéine endogène de 28 kDa. L'expression de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine est plus faible dans le plant 45 $\gamma$ Z B1 que dans C1 (pistes 2 et 3 respectivement). Dans les pistes 1 à 6 de la Fig 13C, une dilution identique des protéines des extraits d'endospermes 15 des plants 45 $\gamma$ Z et 20 $\gamma$ Z avait été déposée sur le gel. A cette dilution , l'expression de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine est détectée seulement dans les endospermes des plants 45 $\gamma$ Z B1 et C1. Cependant, lorsqu'un extrait plus important (40  $\mu$ g de protéines par piste) de protéines 20 $\gamma$ Z est chargé sur le gel, une légère bande (voir flèche), correspondant à la  $\gamma$ -zéine 20 enrichie en lysine est détectée dans les endospermes 20 $\gamma$ Z A1 et D2. Ce résultat indique que les plants 45 $\gamma$ Z accumulent beaucoup plus de protéines selon l'invention que les plants 20 $\gamma$ Z. Ceci est probablement dû aux activités différentes des promoteurs. Les plantes 45 $\gamma$ Z ont été transformées avec un construct contenant la  $\gamma$ -zéine selon l'invention sous 25 le contrôle du promoteur  $\gamma$ -zéine (1,7 kb) alors que les plantes 20 $\gamma$ Z ont été transformées avec la même séquence codante mais sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. La coloration à l'argent est une technique générale de coloration des protéines, mais la forte couleur marron est surtout observée en présence de protéines basiques. Comme les  $\alpha$ -zéines

ont été extraites de la farine, comme décrit ci-dessus, elles sont absentes lors de l'analyse en SDS-page de la Fig 13C.

#### Ségrégation

Puisqu'il y a une ségrégation de 50% dans toutes les plantes transgéniques dans le cas d'un locus unique, une analyse grain par grain a été réalisée afin de quantifier le taux de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine dans chaque transformant. L'analyse a été faite uniquement avec les transformants 45 $\gamma$ Z qui présentaient le plus fort taux d'expression. La figure 14 montre la coloration à l'argent (A) et l'immunoblot avec  $\alpha$ PL (B) de 5 endospermes différents de 45 $\gamma$ Z B1 et C1. La faible bande électrophorétique présente sur toutes les pistes (voir A, pistes 1 à 10) correspond à la  $\gamma$ -zéine endogène. Comme on peut le voir dans la Fig 14 A, 2 des 5 endospermes accumulent de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine (voir pistes 3,4 et 6,7). Par conséquent, environ la moitié des graines accumulent des quantités significatives de protéines enrichies en lysine. Si on prend en compte le fait que des quantités identiques de protéines ont été déposées sur le gel, on observe que le transformant 45 $\gamma$ Z C1 a accumulé plus de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine que B1. En fait ce résultat est en accord avec ce qui est observé lors de la coloration à l'argent des extraits mélangés d'endosperme (Fig 13 C, piste 3). La preuve de la présence de  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine dans ces endospermes est soulignée dans la Fig 14B. L'immunoblot utilisant l'antisérum  $\alpha$ PL montre que 2 extraits d'endosperme de 45 $\gamma$ Z B1 (pistes 3 et 4) et de 45 $\gamma$ Z C1 (pistes 4 et 6) accumulent de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine. Pour confirmer le pourcentage de grains transgéniques, 10 nouveaux grains de transformant 45 $\gamma$ Z C1 ont été analysés par immunoblot et utilisation de l'antisérum  $\alpha$ PL (Fig 15 A). Comme attendu, environ la moitié des graines transgéniques sont détectées. Une bande immunoréactive a été observée dans les extraits d'endosperme (pistes 1,2,9 et 10).

Estimation de la quantité de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine dans les endospermes des transformants 45 $\gamma$ Z:

αG2 est un antisérum polyclonal qui reconnaît les  $\gamma$ -zéines endogènes et les  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine. La réactivité de cet antisérum avec les extraits d'endospermes 45 $\gamma$ Z C1 a été utilisée pour quantifier la quantité de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine selon l'invention dans les endospermes des plantes transformées.

La figure 15B présente l'immunoblot de 5 extraits protéiques correspondant à 5 endospermes 45 $\gamma$ Z C1 (pistes 1 à 5). Comme attendu, seuls 2 endospermes ont présenté un profil d'immunoréaction caractéristique des grains transgéniques. La bande supérieure de 30 kDa correspond à la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine (flèches sur piste 1 et 2) et la bande inférieure à la  $\gamma$ -zéine endogène. On peut noter que dans les endospermes des plantes non transgéniques la bande supérieure est absente (pistes 3, 4 et 5). De façon surprenante, il semble que le contenu en  $\gamma$ -zéine endogène est plus faible dans les extraits des plantes transgéniques que dans les plantes non-transgéniques (voir flèches sur pistes 1 et 5).

A première vue, il a été observé que :

- i) dans les endospermes transgéniques 45 $\gamma$ Z C1, le ratio  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine/ $\gamma$ -zéine endogène est de 7/3. Donc la quantité de protéine modifiée selon l'invention est au moins 2 fois plus importante que celle de la protéine endogène,
- ii) la quantité de  $\gamma$ -zéine endogène dans les endospermes non transgéniques (voir pistes 3, 4 et 5) était équivalente à celle de la  $\gamma$ -zéine enrichie en lysine dans les endospermes transgéniques (voir pistes 1 et 2).

7) Expression de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine recombinantes dans du blé.

Comme dans l'exemple 6), il est possible de montrer la présence de  $\gamma$ -zéines enrichies en lysine selon l'invention dans du blé.

5 La transformation du blé peut notamment être effectuée selon la méthode décrite dans Weeks et al., 1993, Plant Physiol., vol 102 : pages 1077-1084 ou selon la méthode décrite dans EP709462.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide comprenant au moins un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle :
  - n est un entier supérieur ou égal à 2,
  - P représente un résidu d'acide aminé Proline,
  - K représente un résidu d'acide aminé Lysine,
  - le signe "-" symbolise une liaison entre les deux résidus d'acides aminés et notamment une liaison de type peptidique; les n unités  $(P-K)$  étant liées entre elles également par de telles liaisons par exemple de type peptidique.
2. Oligonucléotide selon la revendication 1, comprenant un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle n est un entier supérieur ou égal à 3, de préférence n est égal à 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 15.
3. Oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2, comprenant un enchaînement codant pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , dans laquelle la séquence des n unités  $(P-K)$  est interrompue par un ou plusieurs résidus d'acides aminés différents des résidus P ou K.
4. Oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'enchaînement codant pour le polypeptide comprenant les n unités  $(P-K)$  est complété à son extrémité 5' et/ou à son extrémité 3', par un ou plusieurs codons, codant par exemple pour au moins un résidu lysine à l'extrémité N-terminale du polypeptide formé.
5. Oligonucléotide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide répondant à la formule  $(P-K)_n$ , à la formule  $K(P-K)_4$  ou à la formule  $2K(P-K)_4$ .

6. Séquence de nucléotides recombinant comprenant un enchaînement de nucléotides codant pour une protéine de réserve d'une plante, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, inséré en un site de  
5 l'enchaînement de nucléotides choisi de façon telle que :

- l'expression de la séquence de nucléotides dans une cellule végétale déterminée permet d'obtenir une protéine de réserve modifiée localisée de façon identique ou similaire à la protéine de réserve normale qui serait exprimée dans les mêmes conditions dans la même cellule par  
10 l'enchaînement de nucléotides codant correspondant, et/ou
  - la protéine de réserve modifiée codée par la séquence de nucléotides recombinant est reconnue immunologiquement par des anticorps produits contre la protéine de réserve normale correspondante.

7. Séquence de nucléotides selon la revendication 6,  
15 caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve naturellement pauvre en lysine.

8. Séquence de nucléotides selon la revendication 7,  
caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle  
20 comprend, code pour une protéine de réserve naturellement produite par une plante utilisable en alimentation animale ou humaine.

9. Séquence de nucléotides selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve naturellement produite par une plante de la famille des céréales.  
25

10. Séquence de nucléotides selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve naturellement produite par une plante de la famille des légumineuses ou des crucifères.

11. Séquence de nucléotides selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve de maïs.

12. Séquence de nucléotides selon la revendication 11, 5 caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve de la famille des zéines.

13. Séquence de nucléotides selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve est la  $\gamma$ -zéine du maïs.

14. Séquence de nucléotides selon la revendication 13, 10 caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant pour la  $\gamma$ -zéine de maïs qu'elle contient, répond à la séquence présentée sur la Figure 9.

15. Séquence de nucléotides selon la revendication 7 ou la 15 revendication 8, caractérisée en ce que l'enchaînement de nucléotides codant qu'elle comprend, code pour une protéine de réserve d'une plante choisie parmi les suivantes : le soja, le tournesol, le tabac, le blé, l'avoine, la luzerne, le riz, le colza, Arabidopsis thaliana.

16. Séquence de nucléotides selon la revendication 13 ou la 20 revendication 14, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est inséré à la place ou à la suite du domaine Pro-X ou dans le domaine Pro-X naturellement présent dans la  $\gamma$ -zéine du maïs.

17. Séquence de nucléotides recombinante, caractérisée en ce 25 qu'elle comprend une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 sous le contrôle d'un promoteur d'expression.

18. Séquence de nucléotides recombinante selon la revendication 17, caractérisée en ce que le promoteur est un promoteur spécifique d'un tissu cellulaire déterminé, par exemple un promoteur

spécifique pour l'expression dans les graines, et/ou dans les feuilles de plantes.

19. Séquence de nucléotides selon la revendication 17, caractérisée en ce que le promoteur d'expression est celui de la  $\gamma$ -zéine du maïs.

20. Séquence de nucléotides selon la revendication 17, caractérisée en ce que le promoteur d'expression est le promoteur CaMV35S.

21. Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 16 à 20, caractérisée en ce qu'elle code pour l'un des polypeptides P20 $\gamma$ Z ou PH45 $\gamma$ Z répondant respectivement aux séquences représentées aux figures 11 et 10.

22. Vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend, en un site non essentiel pour sa réPLICATION, une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

23. Vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'un des plasmides pP20 $\gamma$ Z (CNCM N°I-1640), pH30 $\gamma$ Z ou pH45 $\gamma$ Z (CNCM N° I-1639).

24. Polypeptide codé par une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

25.  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée riche en lysine, caractérisée en ce qu'elle est codée par la séquence de nucléotides selon la revendication 13 ou 14.

26.  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée enrichie en lysine, caractérisée en ce que sa séquence d'acides aminés est modifiée par au moins un polypeptide répondant à la formule (P-K)<sub>n</sub> ou à la formule K-(P-K)<sub>n</sub>, dans laquelle :

- n est un entier supérieur ou égal à 2,
- P représente un résidu d'acide aminé Proline,

- K représente un résidu d'acide aminé Lysine,
- le signe "-" symbolise une liaison entre les deux résidus d'acides aminés et notamment une liaison de type peptidique, les n unités (P-K) étant liées par des liaisons notamment de type peptidique, ledit 5 polypeptide répondant à la formule (P-K)<sub>n</sub> ou K-(P-K)<sub>n</sub> étant substitué à une séquence naturellement présente dans la  $\gamma$ -zéine de maïs normale ou étant inséré avec délétion d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine de maïs normale, ou étant ajouté dans la 10 séquence d'acides aminés de la  $\gamma$ -zéine normale, le site d'insertion du polypeptide étant choisi de façon telle que :
  - lorsque la  $\gamma$ -zéine modifiée riche en lysine est produite dans une cellule hôte, notamment une cellule végétale, elle est localisée de façon identique ou similaire à la  $\gamma$ -zéine de maïs normale qui serait produite dans les mêmes conditions, dans la même cellule hôte, et/ou,
  - 15 - la  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée est reconnue par des anticorps dirigés contre la  $\gamma$ -zéine normale de maïs.
- 27.  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine P20 $\gamma$ Z ou de la protéine H30 $\gamma$ Z ou de la protéine H45 $\gamma$ Z.
- 20 28. Cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.
- 29. Cellule hôte selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie, par exemple de E. coli ou Agrobacterium tumefaciens.
- 25 30. Cellule hôte selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.
- 31. Cellule hôte selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de semences de plante.

32. Cellule hôte selon la revendication 31, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'endosperme de semences de maïs.

33. Cellule hôte selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle contient, intégrée de façon stable dans son génome, une séquence 5 de nucléotides selon la revendication 13.

34. Cellule hôte selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle produit une  $\gamma$ -zéine de maïs modifiée riche en lysine selon la revendication 26 ou la revendication 27.

35. Cellule hôte selon la revendication 30, caractérisée en ce 10 qu'il s'agit d'une cellule de soja, de tournesol, de tabac, de blé, d'avoine, de luzerne, de riz, de colza, d'Arabidopsis.

36. Semences produisant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 24 à 27.

37. Plante produisant un polypeptide selon l'une quelconque des 15 revendications 24 à 27.

38. Plante selon la revendication 37, caractérisée en ce qu'il s'agit du maïs.

39. Semences obtenues à partir des plantes selon la revendication 37 ou 38.

20 40. Procédé de production de plantes ou de semences exprimant une protéine de réserve modifiée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

25 a) transformation d'une cellule végétale, avec une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 6 à 17, ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, dans des conditions permettant l'expression de façon stable et fonctionnelle de la protéine de réserve modifiée codée par la séquence de nucléotides;

- b) régénération de plantes à partir de la cellule de plante transformée de l'étape a), pour obtenir des plantes exprimant la protéine de réserve modifiée,
- c) le cas échéant, obtention de semences à partir des plantes modifiées obtenues à l'étape b).

**41.** Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que la plante est le maïs et la protéine de réserve est la  $\gamma$ -zéine.

1 / 17

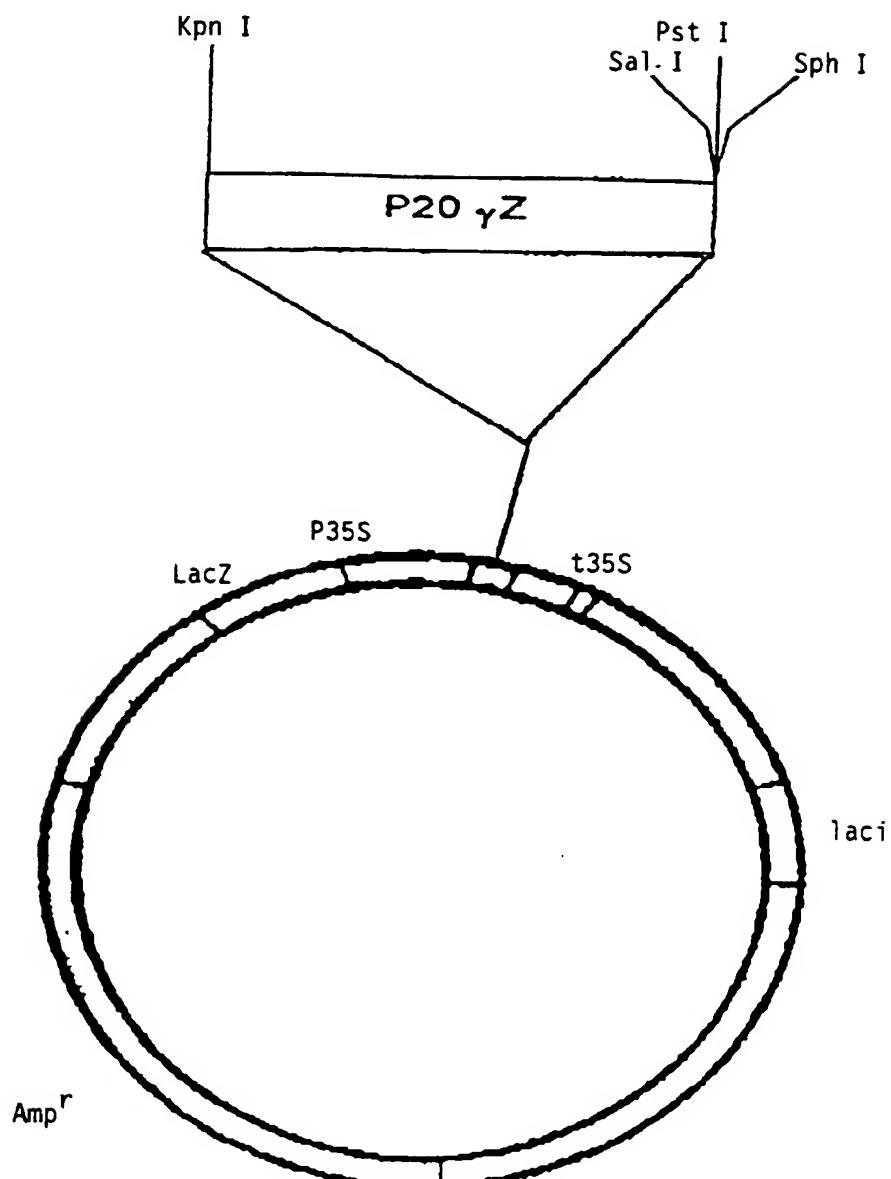
**pP20 $\gamma$ Z**

FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

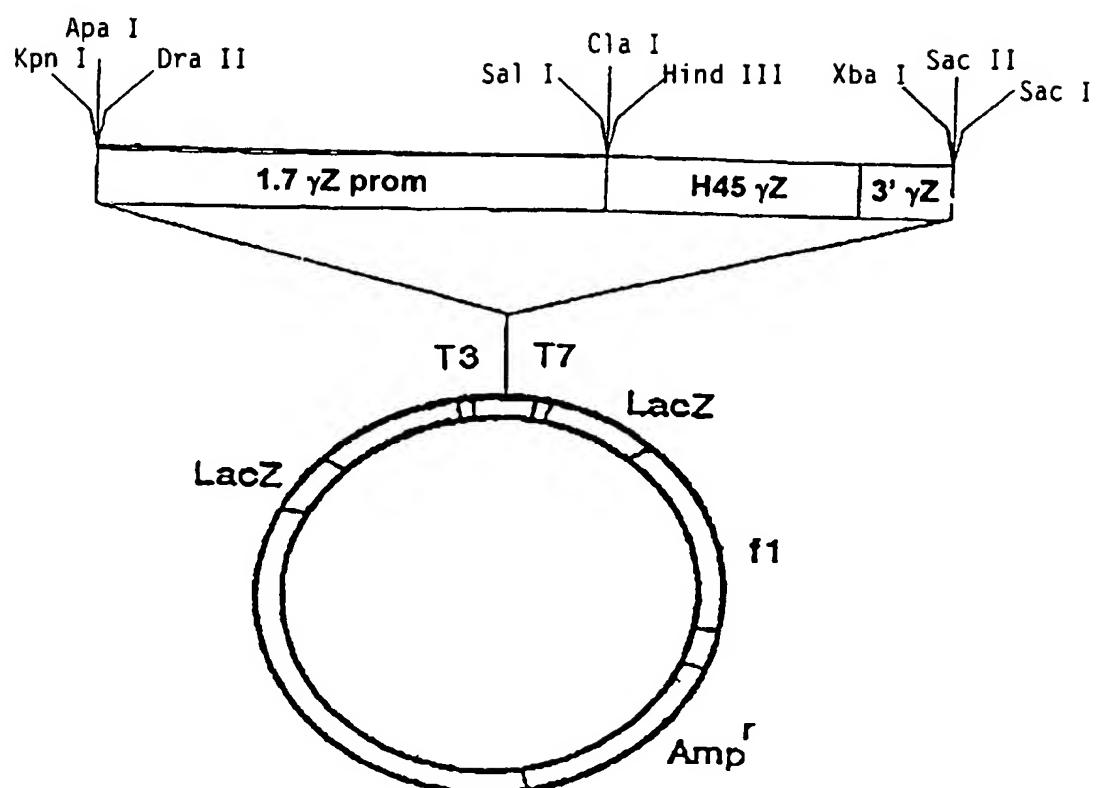
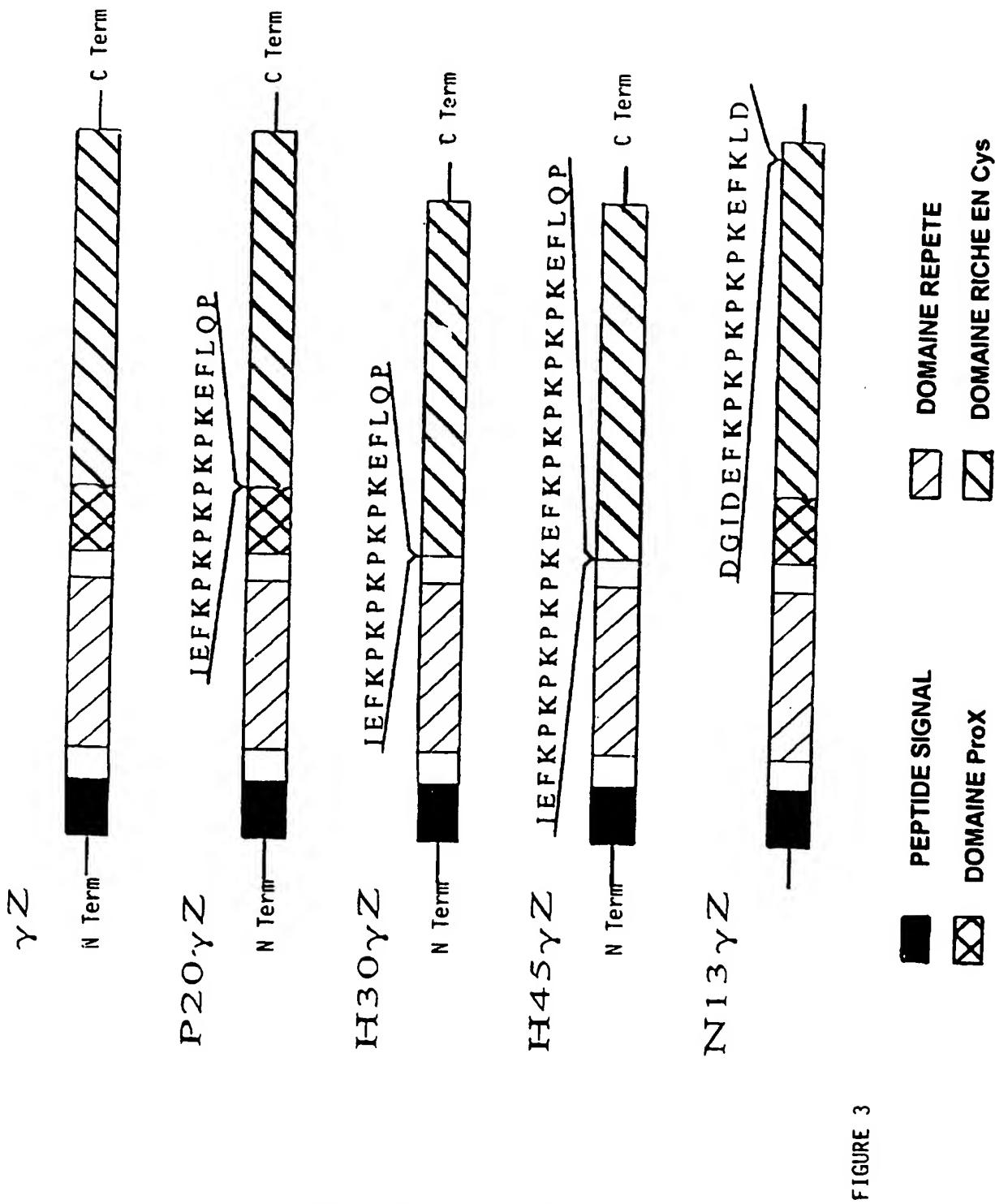
**pH45 $\gamma$ Z**

FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

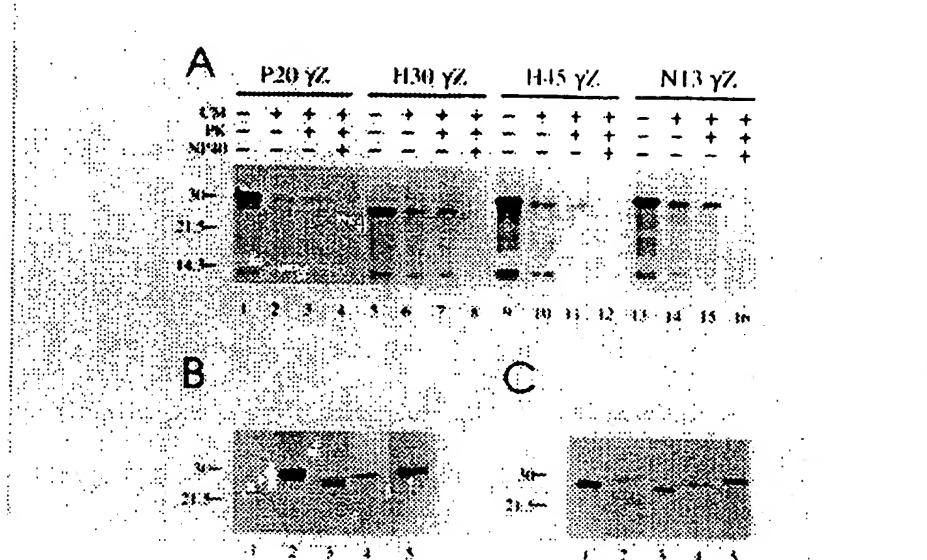
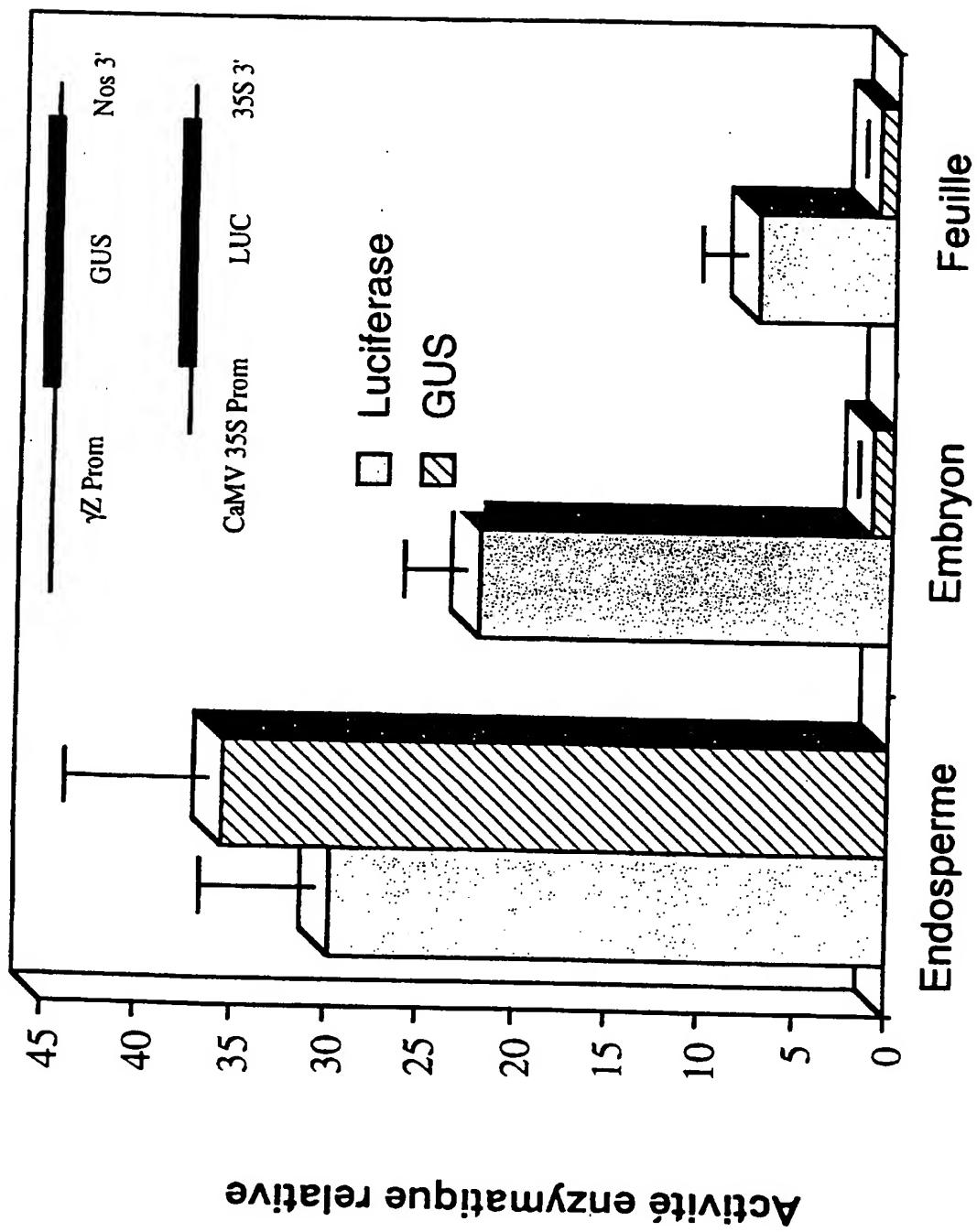


FIGURE 4



FIGURE 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

FIGURE 5

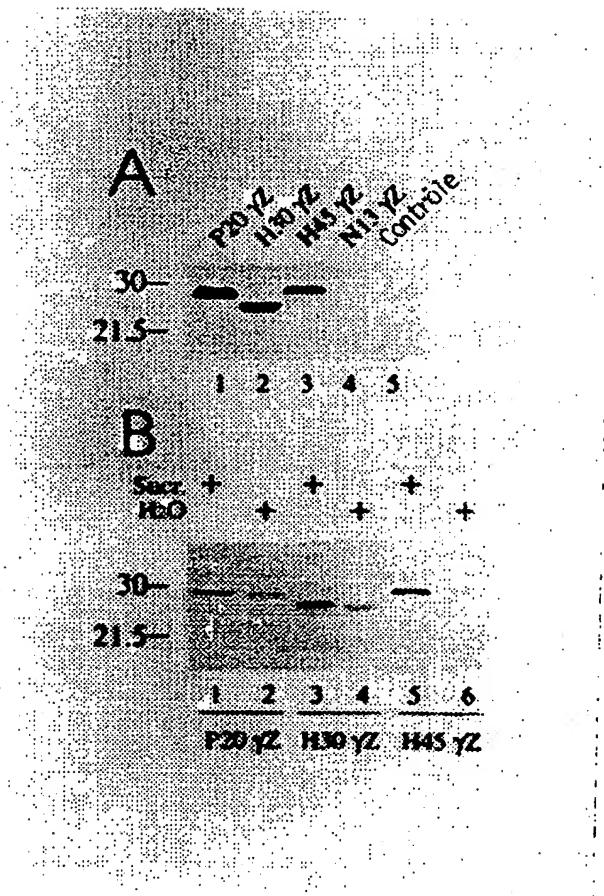


FIGURE 7

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

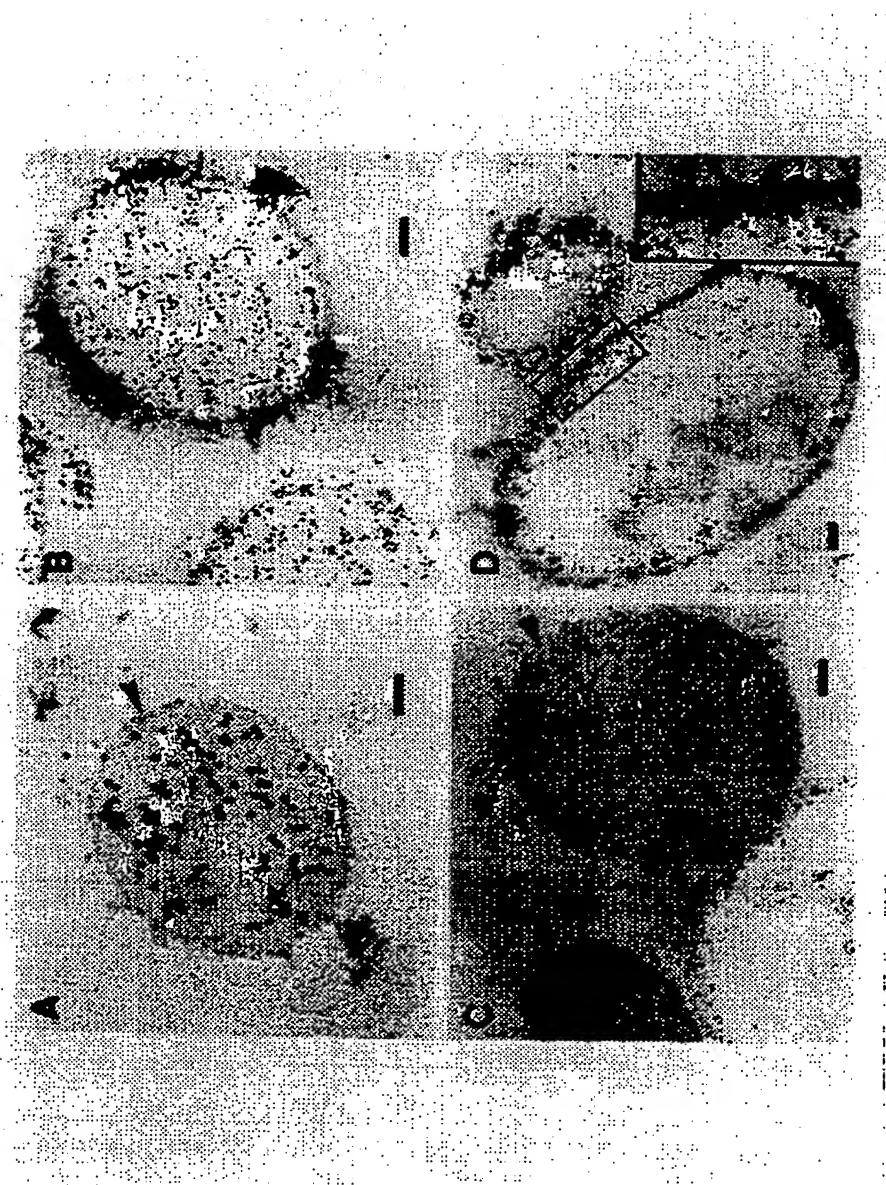


FIGURE 8

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

8 / 17

 $\gamma$ -Zéine

10	20	30	40	50	60
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCGAGCGCCACCTCCACG					
M R V L L V A L A L A L A A S A T S T					
70	80	90	100	110	120
CATAACAAGCGGCGGCTGCCGGCTGCCAGCCACCGCCGCCGGTTCATCTACCGCCGCCGGTG					
H T S G G C G C Q P P P P V H L P P P V					
130	140	150	160	170	180
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCGCCGGTCCACCTG					
H L P P P V H L P P P V H L P P P V H L					
190	200	210	220	230	240
CCGCCGCCGGTCCACCTGCCACCGCCGGTCCATGTGCCGCCGCCGGTTCATCTGCCGCCG					
P P P V H L P P P V H V P P P V H L P P P					
250	260	270	280	290	300
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGCCTCAGCCTCATCCCCAGCCACACCCA					
P P C H Y P T Q P P R P Q P H P Q P H P					
310	320	330	340	350	360
TGCCC GTGCCAACAGCCGCATCCAAGCCC GTGCCAGCTGCAGGGAACCTGCCGGCGTTGGC					
C P C Q Q P H P S P C Q L Q G T C G V G					
370	380	390	400	410	420
AGCACCCCGATCCTGGGCCAGTGCCTCGAGTTCTGAGGCATCAGTGCAGCCCCGACGGCG					
S T P I L G Q C V E F L R H Q C S P T A					
430	440	450	460	470	480
ACGCCCTACTGCTGCCCTCAGTGCCAGTCGTTGCCGGCAGCAGTGTGCCCCAGCTCAGG					
T P Y C S P Q C Q S L R Q Q C C C Q Q L R					
490	500	510	520	530	540
CAGGTGGAGCCGCAGCACCGTACCAAGGCATCTTCGGCTTGGCTCCAGTCCATCCTG					
Q V E P Q H R Y Q A I F G L V L Q S I L					
550	560	570	580	590	600
CAGCAGCAGCCGCAAAGCGGCCAGGTGCCTGGGGCTGTTGGCGGCCAGATAGCGCAGCAA					
Q Q Q P Q S G Q V A G L L A A Q I A Q Q					

FIGURE 9  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

610            620            630            640            650            660  
|              |              |              |              |              |  
CTGACGGCGATGTGCAGGCCTGCAGCAGCCGACTCCATGCCCTACGCTGCTGCCGGCGGT  
L   T   A   M   C   G   L   Q   Q   P   T   P   C   P   Y   A   A   A   G   G  
  
670  
|  
GTCCCCCACTGA  
V   P   H   -

FIGURE 9 (SUITE)

## H45 γ Z

10	20	30	40	50	60
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCAGCGCCACCTCCACG					
M R V L L V A L A L A L A A S A T S T					
70	80	90	100	110	120
CATAACAAGCGGGCGCTGCCAGCCACCGCCGCCGGTTCATCTACCGCCGCCGGTG					
H T S G G C G C Q P P P P V H L P P P P V					
130	140	150	160	170	180
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCAGCCGGTCCACCTG					
H L P P P V H L P P P V H L P P P P V H L					
190	200	210	220	230	240
CCGCCGCCGGTCCACCTGCCACCGCCGGTCCATGTGCCGCCGGTTCATCTGCCGCCG					
P P P V H L P P P V H V P P P V H L P P P					
250	260	270	280	290	300
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGATCGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCG					
P P C H Y P T Q P P R I E F K P K P K P					
310	320	330	340	350	360
AAGCCAAAAGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCGAAGCCAAAAGAATT CCTGCAGCCCCCTG					
K P K E F K P K P K P K E F L Q P L					
370	380	390	400	410	420
CAGGGAACCTGCCGGCGTTGGCAGCACCCCCGATCCTGGGCCAGTGCCTCGAGTTCTGAGG					
Q G T C G V G S T P I L G Q C V E F L R					
430	440	450	460	470	480
CATCAGTGCAGCCCCGACGGCGACGCCCTACTGCTCGCCTCAGTGCCAGTCGTTGCCAG					
H Q C S P T A T P Y C S P Q C Q S L R Q					
490	500	510	520	530	540
CAGTGTGCCAGCAGCTCAGGCAGGTGGAGCCGCAGCACCGGTACCAGGGATCTCGGC					
Q C C Q Q L R Q V E P Q H R Y Q A I F G					
550	560	570	580	590	600
TTGGTCCTCCAGTCCATCCTGCAGCAGCAGCCCAAAGCGGCCAGGTGCCTGGGGCTGTTG					
L V L Q S I L Q Q P Q S G Q V A G L L					
610	620	630	640	650	660
GCGGCGCAGATAGCGCAGCAACTGACGGCGATGTGCCTGCAGCAGCCGACTCCATGC					
A A Q I A Q Q L T A M C G L Q Q P T P C					

FIGURE 10  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

670            680            690  
|            |            |  
CCCTACGCTGCTGCCGGCGGTGTCCCCCACTGA  
P Y A A A G G V P H -

FIGURE 10 (SUITE)

## P20 γZ

10	20	30	40	50	60
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCGAGCGGCCACCTCCACG					
M	R	V	L	L	V
A	L	A	L	L	A
70	80	90	100	110	120
CATACAAGCGGCGGCTGCGGCTGCCAGCCACCGCCGCCGGTTCATCTACCGCCGCCGGTG					
H	T	S	G	G	C
G	C	G	C	Q	P
130	140	150	160	170	180
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCGGCCGGTCCACCTG					
H	L	P	P	V	H
P	P	P	V	H	L
190	200	210	220	230	240
CCGCCGCCGGTCCACCTGCCACCGGCCGGTCCATGTGCCGCCGCCGGTTCATCTGCCGCCG					
P	P	P	V	H	L
P	P	P	H	L	P
250	260	270	280	290	300
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGCTCAGCCTCATCCCCAGCCACACCCA					
P	P	C	H	Y	P
P	T	Q	P	R	P
310	320	330	340	350	360
TGCCC GTGCCAACAGCCGCATCCAAGCCC GTGCCAGATCGAATTCAAACCAAAGCCAAAG					
C	P	C	Q	Q	P
H	P	H	P	S	P
370	380	390	400	410	420
CCGAAGCCAAAAGAATT CCTGCAGCCCCCTGCAGGGAACCTGC GGCGTTGGCAGCACCCCCG					
P	K	P	K	E	F
L	Q	P	L	Q	P
430	440	450	460	470	480
ATCCTGGGCCAGTGC GTCGAGTTCTGAGGCATCAGTGCAGCCCCACGGCGACGCCCTAC					
I	L	G	Q	C	V
Q	C	V	E	F	L
490	500	510	520	530	540
TGCTCGCCTCAGTGCCAGTCGTTGCCGGCAGCAGTGTGCCAGCAGCTCAGGCAGGTGGAG					
C	S	P	Q	C	Q
S	L	R	Q	Q	S
550	560	570	580	590	600
CCGCAGCACCGGTACCAAGGC GATCTCGGCTTGGCTCCAGTCCATCCTGCAGCAGCAG					
P	Q	H	R	Y	Q
Q	A	I	F	G	L
610	620	630	640	650	660
CCGCAAAGCGGCCAGGT CGCGGGCTGTTGGCGGCCAGATAGCGCAGCAACTGACGGCG					
P	Q	S	G	Q	V
Q	V	A	G	L	A

FIGURE 11

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

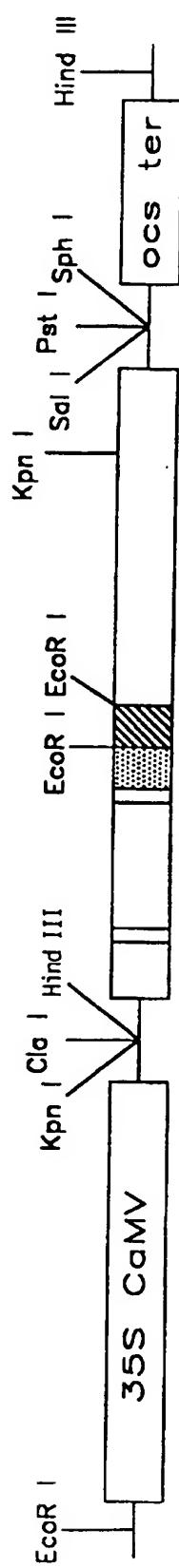
670            680            690            700            710            720  
|            |            |            |            |            |  
ATGTGCGGCCTGCAGCAGCCACTCCATGCCCTACGCTGCTGCCGGCGGTGTCCCCCAC  
M   C   G   L   Q   Q   P   T   P   C   P   Y   A   A   A   A   G   G   V   P   H

TGA

-

FIGURE 11 (SUITE)

**pBin 19 P20 $\gamma$ Z**



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

**pBin 19 H30 $\gamma$ Z**

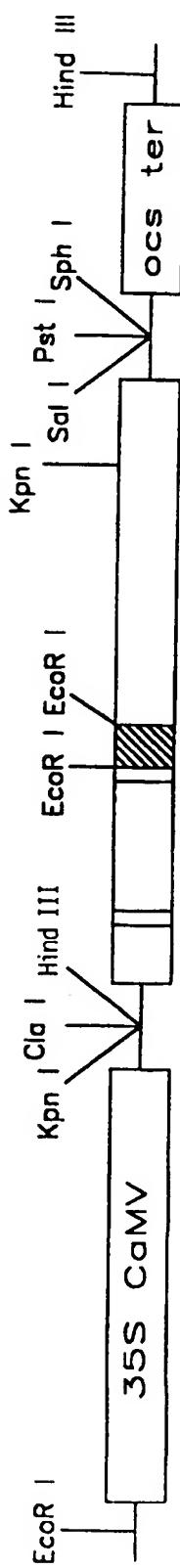


FIGURE 12

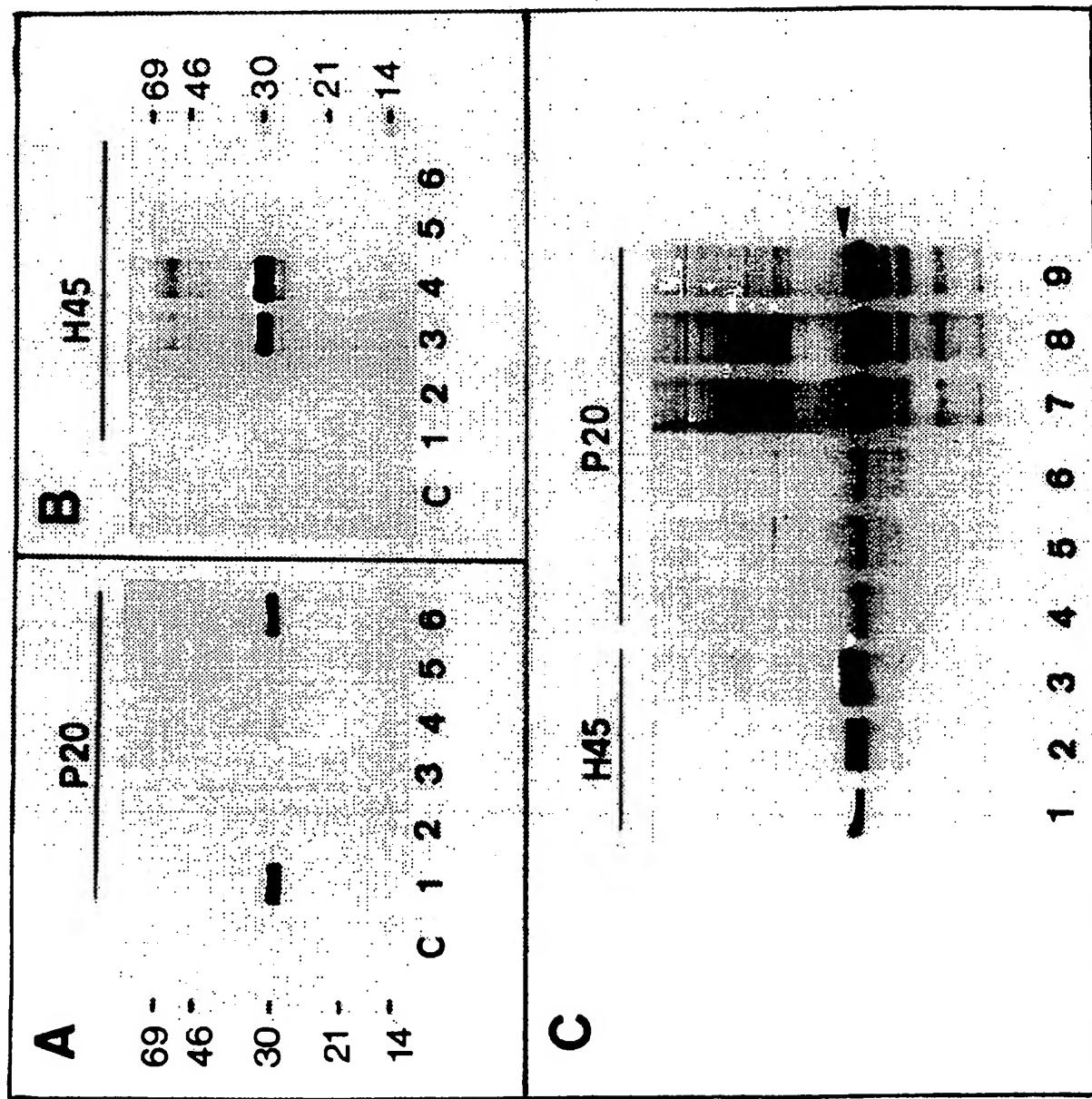


FIGURE 13

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

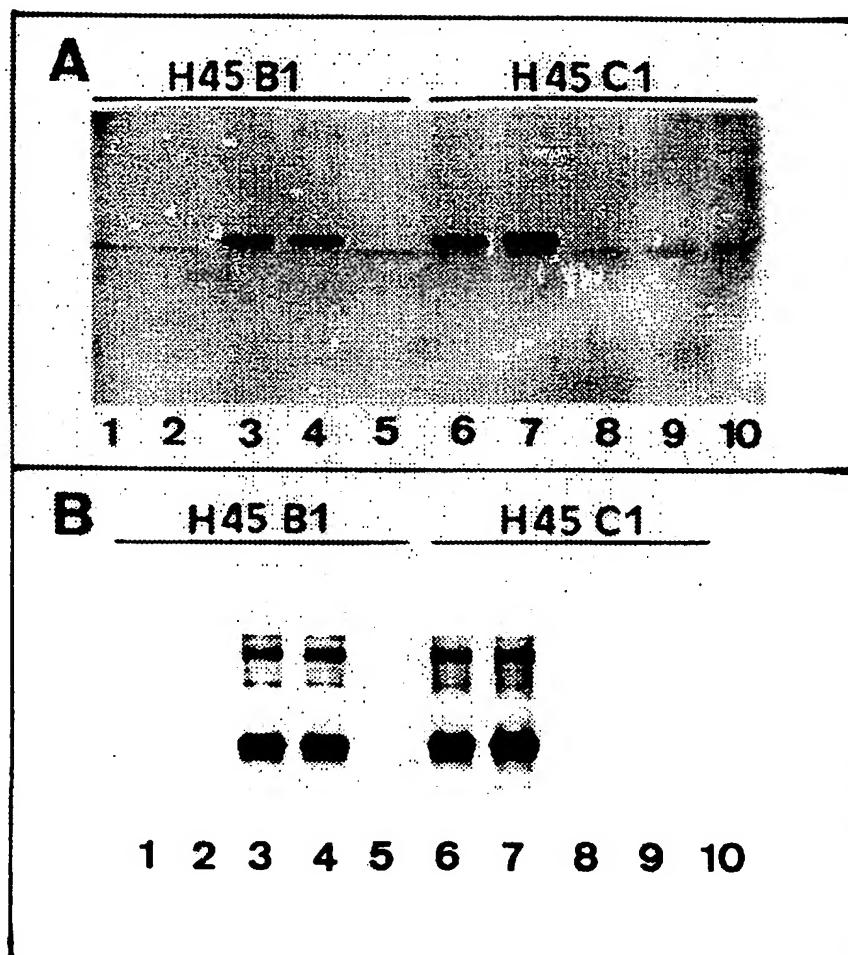


FIGURE 14

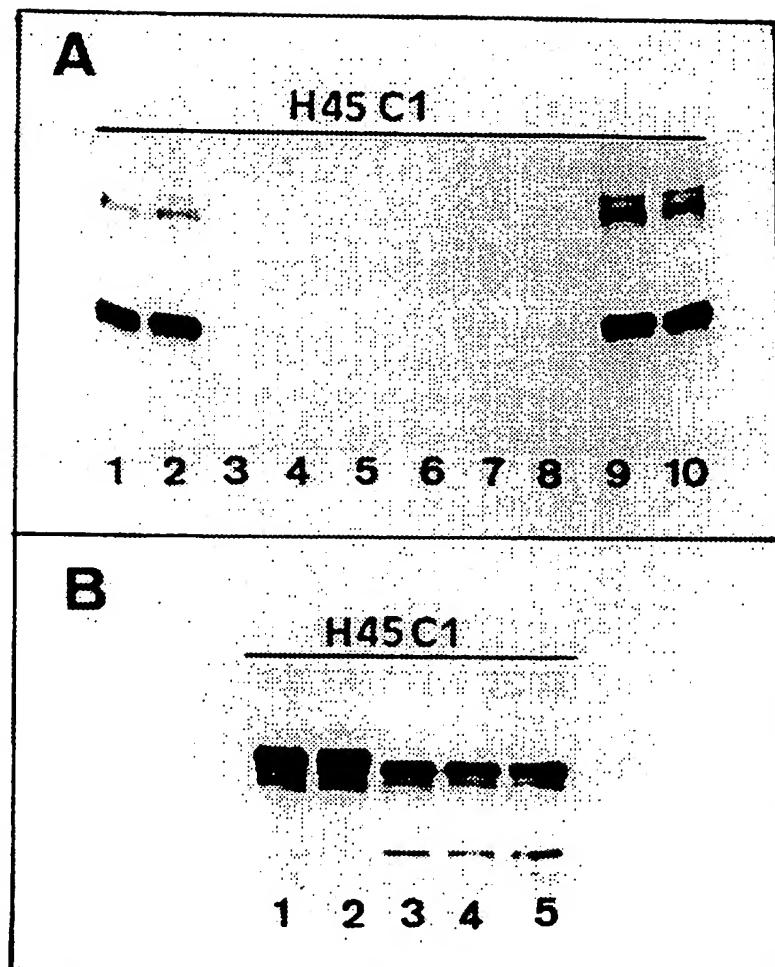


FIGURE 15

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**